

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical



**Aplicação de métodos moleculares ao diagnóstico  
de *Giardia lamblia* e de *Entamoeba* spp.**

Rúben Miguel Lopes Rodrigues

Mestrado de Saúde Tropical (1ª edição)

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical



**Aplicação de métodos moleculares ao diagnóstico  
de *Giardia lamblia* e de *Entamoeba* spp.**

Rúben Miguel Lopes Rodrigues

Mestrado de Saúde Tropical (1ª edição)

Dissertação orientada pela Inv. Doutora Sónia Lima e Prof. Doutor Jorge

Atouguia.

## Resumo

*Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* são protozoários com distribuição mundial que frequentemente infectam o Homem, sendo causadores de elevada morbilidade associada com quadros de diarreia.

Este estudo consistiu na utilização de métodos moleculares na detecção e identificação destes parasitas em amostras de fezes recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal), no período decorrente entre Setembro de 2007 e Agosto de 2009. .

Foi igualmente avaliada a eficácia e custo-benefício de um método alternativo de conservação para material biológico fecal – o papel de filtro, para subsequente extracção de DNA.

Foram analisadas microscopicamente 80 amostras, 23,8 % (19/80) das quais positivas para *Giardia* e 27,5% (22/80) positivas para *Entamoeba* spp.. Através do método molecular da PCR, amplificou-se com sucesso DNA de *Giardia* para o gene *ssurRNA* em 94,7% (18/19) das amostras microscopicamente positivas. No que se refere às amostras positivas por exame microscópico para *Entamoeba* spp foi detectada *E. dispar* em 50,0% (11/22) das amostras após amplificação de parte do gene 16S *rRNA*. Adicionalmente foi também detectado DNA de *E. histolytica* em 20,0% (4/20) das amostras analisadas, microscopicamente negativas para *Entamoeba* spp..

Neste estudo realizou-se a genotipagem de *G. lamblia* utilizando parte dos genes *bg* (*beta-giardina*), *tpi* (*triose-fosfato isomerase*) e *gdh* (*glutamato desidrogenase*), que revelou haver 61,5% (8/13) dos isolados pertencentes ao genótipo B e 38,5% (5/13) do genótipo A.

A determinação de subgenótipos através da análise de SNP's para os 3 genes só foi possível para o gene *bg* do genótipo A, revelando 3 amostras correspondentes ao subgenótipo A2 e uma para o subgenótipo A3. Para os restantes genes não foi possível a determinação de subgenótipos devido à presença de polimorfismos genéticos para ambos os genótipos A e B.

Realizou-se também a análise filogenética concatenada que apenas permitiu a integração de três amostras identificadas com o genótipo A no subgenótipo All.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a microscopia associada às técnicas moleculares possibilita a diferenciação das espécies do complexo *Entamoeba* favorecendo o correcto diagnóstico desta patologia e consequente tratamento. Para além disso, o uso dos métodos moleculares contribuiu para o esclarecimento e compreensão dos genótipos de *Giardia* em humanos.

Neste estudo a utilização do método de conservação, papel de filtro apresentou um menor custo e elevada eficácia em relação aos métodos normalmente utilizados, conservação a -20°C. Sugerindo a sua utilização com sucesso em estudos epidemiológicos em especial em zonas endémicas de condições precárias.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* are two protozoa that are worldwide distributed commonly infecting men and causing elevated morbidity associated with diarrheal disease.

In this study we used molecular techniques to detect and identify these parasites in the fecal samples received in the Pathology Laboratory of the Institute of Tropical Medicine and Hygiene (Lisbon, Portugal) in the period of September 2007 and August 2009.

We equally evaluated the efficiency and cost-effectiveness of the stool sample conservation method – FTA filter paper and subsequent DNA extraction.

A total of 80 samples were examined by microscopy. The protozoan parasite *Giardia lamblia* was detected in 23,8 % (19/80) of the isolates and *Entamoeba* spp. in 27,5% (22/80). *G.lamblia* and *E.dispar* were detected by PCR in 94,7% (18/19) and 50,0% (11/22) of the microscopy positive isolates, respectively. Additionally it was detected DNA of *E.histolytica* in 20,0% (4/20) of the samples microscopically negative for *Entamoeba* spp.

Genotyping of *G. lamblia* for the genes  $\beta$ -giardin (*bg*), triose phosphate isomerase (*tpi*) and glutamate dehydrogenase (*gdh*) has shown that genotype B (61.5% - 8/13) was more prevalent than genotype A (38,5% - 5/13).

A Single Nucleotide Polymorphism's (SNP) analysis for the three genes of *Giardia* was conducted in order to assess the subassemblage level of the tested samples. However we were only able to determine the subassemblage level for samples of *bg* gene belonging to genotype A, where three samples corresponded to

subassemblage A2 and one to subassemblage A3. In the remaining genes, due to the high genetic polymorphisms for both genotypes A and B the subassemblage level was not possible to determine.

Phylogenetic concatenated analysis was also carried out allowing the association of three samples with subassemblage All.

The results of our study show that the microscopy in combination with molecular techniques allow the differentiation of *Entamoeba* species favoring the correct diagnosis and subsequent treatment of this disease. In addition, the use of molecular methods contributed to the clarification and understanding of the genotypes of *Giardia* infections in humans.

In this study, the use of the FTA filter paper preservation method showed a lower cost and high effectiveness when compared to the commonly used methods, (storage at -20 ° C), suggesting that it can be successfully I epidemiological studies used in endemic areas with poor laboratory conditions.

**Palavras-chave:**

*Giardia lamblia*

*Entamoeba* spp.

Microscopia

Genotipagem

Papel de Filtro

**Keywords:**

*Giardia lamblia*

*Entamoeba* spp.

Microscopy

Genotyping

FTA filter paper

# Índice

Resumo	2
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
Palavras chave	6
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas	12
Agradecimentos	13
I. Introdução	16
I.1 - História	17
a) <i>Giardia</i>	17
b) <i>Entamoeba</i>	18
I.2 - Taxonomia	19
a) <i>Giardia</i>	19
b) <i>Entamoeba</i>	20
I.3 – Agente etiológico e ciclo de vida	21
a) <i>Giardia</i>	21
b) <i>Entamoeba</i>	23
I.4. Epidemiologia	25
a) <i>Giardia</i>	25
b) <i>Entamoeba</i>	27
I.5. Características clínicas	29
a) <i>Giardia</i>	29
b) <i>Entamoeba</i>	31
I.6. Diagnóstico	34
a.1) <i>Giardia</i> - Microscopia	34
a.2) <i>Giardia</i> – Testes imunológicos	34
a.3) <i>Giardia</i> – Diagnóstico molecular e Genotipagem	35
b.1) <i>Entamoeba</i> - Microscopia	36
b.2) <i>Entamoeba</i> – Testes imunológicos	37
b.3) <i>Entamoeba</i> – Diagnóstico molecular	38
II. - Objectivos	41
II.1- Objectivos gerais	41
II.2 – Objectivos específicos	41
III. Material e métodos	43
III.1. Origem das amostras	43
III.2. Conservação das amostras	44
III.3. Exame parasitológico	44
III.4. Extracção de DNA	44
III.5. Amplificação de DNA	45
III.6. Sequenciação de DNA	48
III.7. Análise filogenética e Caracterização molecular	48
IV. Resultados	50
IV.1. Microscopia	50
IV.2. Comparação da eficácia dos métodos de extracção de DNA a partir de fezes conservadas a -20°C e em papel de filtro	54



a) <i>Giardia</i>	55
b) <i>Entamoeba</i>	56
IV.3. Comparação do custo, duração e equipamento dos métodos de extracção de DNA a partir de fezes conservadas a -20°C e em papel de filtro	58
IV.4. Diagnóstico molecular	59
IV.4.1. Amplificação do gene humano 18S	60
IV.4.2. Amplificação do gene ssurRNA ( <i>Giardia</i> )	60
IV.4.3. Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de <i>E. histolytica</i> , <i>E. moshkovskii</i> e <i>E. dispar</i>	62
IV.5 - Genotipagem de <i>G. lamblia</i>	64
IV.5.1 - Amplificação do gene $\beta$ -giardina, tpi e gdh	64
IV.6 - Análise filogenética das sequências de DNA de bg, tpi e gdh	76
V. Discussão	82
VI. Bibliografia	99

## Índice de Figuras

<b>Fig.1</b> – Taxonomia parasita <i>G. lamblia</i>	<b>20</b>
<b>Fig.2</b> – Taxonomia parasita <i>E. histolytica</i>	<b>21</b>
<b>Fig.3</b> – Ciclo de Vida <i>Giardia lamblia</i>	<b>23</b>
<b>Fig.4</b> – Ciclo de Vida <i>E. histolytica</i>	<b>24</b>
<b>Fig.5</b> - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento de 305 pb do gene humano 18S em amostras de DNA humano.	<b>60</b>
<b>Fig.6</b> - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento do gene ssurRNA – 175 pb em amostras de DNA humano.	<b>61</b>
<b>Fig.7</b> - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento do gene 16S de <i>E. histolytica</i> (439 pb), <i>E. moshkovskii</i> (553 pb) e <i>E. dispar</i> (174 pb) em amostras de DNA humano.	<b>64</b>
<b>Fig.8 (a, b, c)</b> - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação dos fragmentos dos genes <i>bg</i> (511 pb), <i>tpi</i> (530 pb) e <i>gdh</i> (530 pb) em amostras de DNA humano.	<b>64</b>
<b>Fig.9.</b> Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene <i>bg</i> de <i>Giardia</i> utilizando o algoritmo <i>neighbour-joining</i> .	<b>78</b>
<b>Fig.10.</b> Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene <i>tpi</i> de <i>Giardia</i> utilizando o algoritmo <i>neighbour-joining</i> .	<b>79</b>
<b>Fig.11.</b> Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene <i>gdh</i> de <i>Giardia</i> utilizando o algoritmo <i>neighbour-joining</i> .	<b>80</b>
<b>Fig. 12.</b> Árvore concatenada representativa das relações filogenéticas das sequências do gene <i>bg</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> de <i>Giardia</i> utilizando o algoritmo <i>neighbour-joining</i> .	<b>81</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela.1</b> – Tratamento para amebíase	<b>33</b>
<b>Tabela.2</b> – Amostras analisadas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT, por país de origem e respectiva estadia em país Tropical (n=80)	<b>43</b>
<b>Tabela.3</b> – Condições de amplificação utilizadas para o gene humano 18S	<b>45</b>
<b>Tabela.4</b> – Condições de amplificação utilizadas para a detecção de <i>Entamoeba</i> spp	<b>46</b>
<b>Tabela.5</b> – Condições de amplificação utilizadas para os genes <i>ssurRNA</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> de <i>Giardia lamblia</i>	<b>47</b>
<b>Tabela.6</b> – Resultado da análise parasitológica em amostras de fezes com suspeita clínica de Parasitoses intestinais recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT e respectiva microscopia	<b>50</b>
<b>Tabela.7</b> - Amostras de fezes analisadas neste estudo (n=80).	<b>51</b>
<b>Tabela.8</b> - Amostras fecais para pesquisa de <i>G. lamblia</i> conservadas a -20°C (Kit) e decalcadas em papel de filtro (PF), frescas (n=11) e após descongelamento (n=4).	<b>56</b>
<b>Tabela.9</b> - Amostras fecais para pesquisa de <i>Entamoeba</i> spp. conservadas a -20°C (Kit) e decalcadas em papel de filtro a fresco (n=9) e após descongelamento (n=5).	<b>56</b>
<b>Tabela.10</b> – Amostras utilizadas na comparação de métodos de extracção kitQ e GQ.	<b>57</b>
<b>Tabela.11</b> – Custos e materiais utilizados na extracção pelo Kit Qiagen, por amostra.	<b>59</b>
<b>Tabela.12</b> – Custos e materiais utilizados na extracção pelo PF, por amostra.	<b>59</b>
<b>Tabela.13</b> – Comparação do custo, materiais e duração das extracção kitQ e GQ.	<b>59</b>
<b>Tabela.14</b> – Total de amostras microscopicamente positivas e testadas por PCR para a amplificação do gene <i>ssurRNA</i> de <i>Giardia</i> .	<b>61</b>
<b>Tabela.15</b> – Total de amostras microscopicamente positivas e testadas por PCR para a amplificação do fragmento 16S de <i>Entamoeba</i> spp..	<b>62</b>
<b>Tabela.16</b> – Amostras testadas por PCR para a amplificação do fragmento 16S de <i>Entamoeba</i> spp..	<b>62</b>
<b>Tabela.17</b> – Amostras testadas por PCR para a amplificação dos genes <i>ssurRNA</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i> , <i>gdh</i> de <i>G. lamblia</i> .	<b>66</b>
<b>Tabela.18</b> – Amostras amplificadas por PCR e sequenciadas para os genes <i>bg</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> de <i>Giardia</i> sp.	<b>66</b>
<b>Tabela.19</b> - Genótipo das amostras sequenciadas para os genes da <i>bg</i> , <i>tpi</i> e <i>gdh</i> de <i>Giardia</i> obtidas para comparação com as sequências depositadas no GenBank <sup>TM</sup>	<b>68</b>
<b>Tabela.20</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene <i>bg</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>70</b>

<b>Tabela.21</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene <i>bg</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>71</b>
<b>Tabela.22</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene <i>tpi</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>72</b>
<b>Tabela.23</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene <i>tpi</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>73</b>
<b>Tabela.24</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene <i>gdh</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>74</b>
<b>Tabela.25</b> - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene <i>gdh</i> em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)	<b>75</b>
<b>Tabela.26</b> – Comparação dos três loci para a identificação dos isolados de <i>Giardia</i> a nível de genótipo e subgenótipo.	<b>76</b>

## Lista de Abreviaturas

OMS - Organização Mundial de Saúde

*bg* -  $\beta$ -giardina

*tpi* - Triose–fosfato isomerase

*gdh* - Glutamato desidrogenase

PCR - Polymerase Chain Reaction

IFAT -imunofluorescência indirecta para anticorpos

CIEP - imunoelectroforese reversa

SNP - *single nucleotid polymorphism*

GQ - *Generation® Capture Card Kit, Qiagen*

kitQ - *QIAamp® DNA Stool Mini Kit (kitQ)*

## Agradecimentos

A elaboração deste projecto de mestrado apenas foi possível com o contributo de várias pessoas às quais gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar agradeço à Doutora Sónia Lima, Investigadora Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), responsável pela orientação desta dissertação, por todo o apoio prestado, pela paciência que teve por me aturar, por todos os bons conselhos e orientação dados ao longo deste trabalho, por me ter acolhido e incentivado a fazer aquilo que gosto, pela força de vontade e bom humor incansáveis que muito apoiaram este estudo e por tão bem me ter acolhido e fazer sentir da casa.

Ao Doutor Jorge Atouguia, Professor Associado Director da Unidade Clínica Doenças Tropicais (IHMT) por me receber na sua Unidade, ter disponibilizado os meios para a realização deste mestrado e pela revisão da dissertação.

Ao Doutor Luís Távora Távora, Investigador Auxiliar Coordenador do Laboratório de Patologia Tropical, Coordenador do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais Laboratório Associado (CMDT.LA/IHMT) pela disponibilização dos meios para a realização deste mestrado.

À Laura Cravo, Técnica Principal do Laboratório de Patologia Tropical, pela sua análise nos exames parasitológicos, pela sua paciência e boa disposição, pelos momentos humorísticos passados no laboratório e pela boa companhia.

Ao Doutor Ricardo Parreira, Professor Auxiliar da Unidade de Virologia, pela sua ajuda e esclarecimentos prestados na análise de resultados.

Ao Doutor Nuno Rolão, Investigador Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) pela amizade que forneceu, por todos os momentos de lazer e piada, pelas momentos passados a jogar futebol e aquelas conversas que só a nós homens de baba rija dizem respeito.

À Joana Gomes e Ana Maria Fonseca companheiras de gabinete, e de trabalho pela ajuda dada e apoio, pela boa companhia e incentivo e motivação para a conclusão deste trabalho, pela ajuda e ensino na integração neste grande grupo de trabalho, e em especial por serem muito boas amigas, apesar de...

À Filipa Santana Ferreira, a minha capataz (no bom sentido) que nunca me deixou parar, incentivou sempre a fazer e a querer mais e mais, que acreditou sempre em mim, que foi companheira das maluquices e “vipes” que davam na elaboração deste trabalho, pelos ensinamentos e ajuda na integração neste grupo de trabalho e em especial por ser quem é, que no caso dela só por si JÁ É MUITA COISA.

À Formosa Figueiredo, Auxiliar Técnica de Laboratório, pela sua amizade, pelo seu companheirismo, pelos seus mimos e sorrisos que iluminaram os dias mais escuros.

A todos aqueles que me ajudaram ao longo destes dois anos de trabalho.

À minha família, pelo apoio, incentivo, ajuda, paciência e aturarem-me nos maus e bons momentos e por aguentarem com o meu mau humor de vez em quando, em especial porque aqueles que tão perto são por vezes os que mais negligenciamos e precisam de nós, mas nunca são esquecidos principalmente por aquilo em que ajudaram a me tornar.

Agora o agradecimento aquela pessoa mais que especial, que me fez seguir e vir pa este mestrado, aquela pessoa que sempre quis mais para mim e sempre quis o melhor para mim, por todo o tempo passado juntos, por todas as vezes que nos chateámos, que tivemos afastados e por tudo aquilo que passámos, em ti especialmente quero-te agradecer, porque sei que se hoje sou aquilo que eu sou muito é a ti que eu devo, devo-te isto e muito mais, mas isso seria material demasiado extenso para a escrita nestes agradecimentos, resta-me dizer o apenas – OBRIGADO ANA.

O trabalho apresentado foi realizado nos laboratórios do CMDT/IHMT. A sua concretização só foi possível devido ao financiamento cedido e aos meios disponibilizados pelo CMDT e Unidade Clínica das Doenças Tropicais.



## I. - Introdução

As parasitoses intestinais são uma das infecções mais comuns a nível mundial, sendo responsáveis por uma considerável taxa de mortalidade e morbilidade, afectando indivíduos de todas as idades e ambos os sexos (Lopez et al 2008; Mbuh et al 2010). Apesar de despertarem um menor interesse público que outras doenças, como a Tuberculose e VIH/SIDA, as parasitoses intestinais constituem igualmente um grande problema de Saúde Pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS), estimou que em 2002 cerca de 450 milhões de pessoas estariam doentes devido a parasitas do tracto intestinal, mas que até 3.5 biliões poderiam estar infectadas (WHO, 2001; Ouattara et al 2010).

Os parasitas intestinais, que incluem protozoários e helmintas, são responsáveis por infecções em humanos em todo o mundo, sendo os protozoários considerados dos principais agentes patogénicos responsáveis pela doença diarreica (Aranda-Michel & Gianella, 1999; Huh et al 2009). Considerando o esforço que está a ser feito para uma melhor compreensão da epidemiologia dos helmintas, há relativamente poucos estudos equivalentes realizados em protozoários intestinais (Ouattara et al 2010).

*Giardia lamblia* (também conhecido por *G.duodenalis* ou *G. intestinalis*) e *Entamoeba histolytica* são reconhecidos como os parasitas protozoários intestinais que mais frequentemente infectam o Homem (Wang et al 2004).

*E. histolytica* é o protozoário responsável pela amebíase intestinal, a terceira maior causa de morte por doenças parasitárias no mundo, após a malária e schistosomíase. A giardíase, causada pelo agente parasitário *G. lamblia* é uma das

principais causas de diarreia, provocando sobretudo um impacto negativo sobre o crescimento e desenvolvimento infantil (Hove et al 2009; Huh et al 2009).

As desordens gastrointestinais representam uma das principais patologias que afectam o grupo dos viajantes a países Tropicais e Sub-tropicais. Cerca de 25 a 50% destes viajantes, desenvolvem doença diarreica, sendo os protozoários a principal causa da diarreia crónica (Ekdahl & Andersson, 2005; Hove et al 2009).

*G.lamblia* e *E. histolytica* são as causas mais frequentes da infecção intestinal por protozoários que afecta os viajantes (Weitzel et al 2006).

## **I.1 - História**

### *a) Giardia*

O agente etiológico, *G. lamblia*, foi inicialmente descrito em 1681, por Antonie Leeuwenhoek ao examinar as suas próprias fezes ao microscópio. No entanto, apenas em 1859 é que este organismo foi descrito com mais detalhe por Lambl (Adam, 2001). Inicialmente pensou-se que seria um microrganismo comensal em humanos (Ortega & Adam, 1997). Porém, actualmente, sabe-se que *G.lamblia*, é uma das principais causas de doença diarreica em humanos e animais em todo o mundo (Almeida et al 2006).

A utilização do termo *Giardia* como género, ocorreu pela primeira vez em 1882, por Kunstler em que descreveu estes organismos em girinos. Contudo ao longo dos anos, devido à especificidade dos hospedeiros e dados morfológicos, foram sugeridas mais de quarenta espécies de *Giardia* (Adam,2001). Em 1952, Filice, propôs apenas três grupos de espécies - *G.agilis* (parasita de anfíbios), *G.muris* (infecta roedores, pássaros e répteis) e *G. lamblia* (homem, pássaros e répteis), baseando-se na

morfologia dos corpos meridianos como factor diferencial (Kulda & Nohýnková – 1995; Thompson et al 2000).

Em 1970, a denominação *G. lamblia* foi dada ao parasita responsável pela infecção no homem, mas a partir de 1980 alguns investigadores incentivaram o uso do nome *G. duodenalis*. Em 1990 iniciou-se a utilização do termo *G. intestinalis*. (Adam, 2001)

#### *b) Entamoeba*

Em 1873, na Rússia, o assistente clínico, D.F. Lösch, identificou pela primeira vez os microrganismos que são hoje designados, como amibas (Roberts & Janovy, 2005). Estes foram observados na amostra de fezes de um paciente, com disenteria sanguinolenta, apesar de não lhes ter atribuído a causa da sintomatologia (Pinilla et al 2008). Devido à existência de várias espécies de amibas presentes no intestino humano, só cerca de 40 anos mais tarde foi aceite que as amibas poderiam causar doença intestinal (Roberts & Janovy, 2005). Após esta consideração e juntamente com a identificação de espécies não patogénicas, Schaudinn em 1903, denominou este grupo de amibas patogénicas como *Entamoeba histolytica* (Roberts & Janovy, 2005). O termo *histolytica* foi atribuído devido à habilidade destes microrganismos lisarem os tecidos (Pinilla et al 2008).

## I.2 – Taxonomia

### a) *Giardia*

Em 1980, Protozoa era considerado um subreino com sete filos. O Sarcomastigophora (que inclui os Mastigophora e Sarcodina), Apicomplexa, Microspora, *Myxozoa*, e Ciliophora englobavam parasitas importantes. A classificação taxonómica mais recente estabelece os Protozoa como o reino base dos Eucariotas e abrange 13 filos. Os flagelados, pertencentes anteriormente ao subfilo Mastigophora estão agora distribuídos pelos quatro filos Metamonada, Parabasalia, Percolozoa e *Euglenozoa*. Esta nova classificação taxonómica provém não só dos estudos moleculares, mas também da integração desta informação com outras várias áreas de estudos, como genética, estudos estruturais e bioquímicos. Na sistemática antiga, baseada apenas na morfologia o protozoário *Giardia* pertencia ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora (=flagelados), Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae, de acordo com a nova sistemática, baseada em dados genéticos, estruturais e bioquímicos, o parasita é actualmente classificado como descrito na Fig. 1 (Plutzer et al 2010).

**Filo: Metamonada**

**Subfilo: Trichozoa**

**Classe: Trepomonadea**

**Ordem: Giardiida**

**Família: Giardiidae**

**Gênero: *Giardia***

**Espécie: *G. lamblia***

Fig.1 – Taxonomia parasita *G. lamblia* (Plutzer et al 2010).

*b) Entamoeba*

O complexo *Entamoeba* foi considerado por alguns autores como uma ramificação precoce da linhagem Eucariota, uma vez que não possui mitocôndrias, peroxissomas, retículo endoplasmático rugoso, sistema de Golgi e possui um sistema glicolítico invulgar. Estudos filogenéticos baseados na análise da pequena subunidade ribossomal do RNA colocam *E. histolytica* num ramo que surgiu mais recentemente que várias linhagens com organelos e metabolismo típico de eucariotas (Farthing et al, 2009).

Em 1998, Cavalier-Smith reviu a posição de *E. histolytica*, enquadrando-a no reino Protozoa, subreino Neozoa, infra-reino Sarcomastigota, filo Amoebozoa e subfilo Conosa, Classe Archamoebae, Ordem Pelbiontida, Família Entamoebidae, Gênero *Entamoeba* (Fig. 2) (Cavalier-Smith, 1998; Cavalier-Smith, 2004; Farthing et al, 2009).

No género *Entamoeba*, as espécies são diferenciadas de acordo com as dimensões do quisto e estrutura nuclear (Fig.2). Das diversas famílias de amibas, apenas os membros da família Entamoebidae são de grande importância médica (Roberts & Janovy, 2005).

**Filo: Amoebozoa**

**Classe: Archamoebae**

**Ordem: Pelbiontida**

**Família: Entamoebidae**

**Género: *Entamoeba***

**Espécie: *E. histolytica***

Fig.2 – Taxonomia parasita *E. histolytica* (Cavalier-Smith, 1998; Cavalier-Smith, 2004; Farthing et al, 2009)

### **I.3 - Agente etiológico e Ciclo de Vida**

#### **a) *Giardia***

*G.lamblia* é um microrganismo eucariota, flagelado unicelular. Durante o seu ciclo de vida, *Giardia* possui dois estádios diferentes – trofozoíto e quisto (Garcia, 2001).

No estágio vegetativo, correspondente ao trofozoíto, apresenta forma arredondada na região anterior e afilada na região posterior, assemelhando-se a uma

pêra. (Farthing et al, 2009) O trofozoíto mede cerca de 9 a 21  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5 a 15  $\mu\text{m}$  de largura (Farthing et al, 2009). Possui dois núcleos de tamanho idêntico, quatro pares de flagelos e um disco adesivo na região ventral que permite a sua adesão à mucosa intestinal (Farthing et al, 2009). Nesta fase, ocorre a sua multiplicação por fissão binária longitudinal no lúmen do intestino (Farthing et al, 2009).

Os quistos, a forma de resistência, são responsáveis pela transmissão da doença, medem entre 8 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento e 7 a 10  $\mu\text{m}$  de largura, apresentam uma forma arredondada ou oval, com uma parede rígida e hialina, e quatro núcleos quando maduros (Garcia, 2001).

A transmissão ocorre através de um ciclo fecal-oral, directamente de pessoa a pessoa, ou indirectamente através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados (Farthing et al, 2009).

Com a ingestão dos quistos, inicia-se o ciclo de vida da *Giardia*. Os ácidos gástricos e enzimas pancreáticas promovem o desenquistamento a nível do duodeno, libertando dois trofozoítos a partir de um único quisto. (Fig.3) Os trofozoítos migram para o intestino grosso, onde vai ocorrer o processo de enquistamento, pensa-se que devido à presença de sais biliares e ausência de colesterol. Trofozoítos e quistos, são eliminados nas fezes, sendo que apenas os últimos sobrevivem às condições do ambiente externo (Farthing et al, 2009).

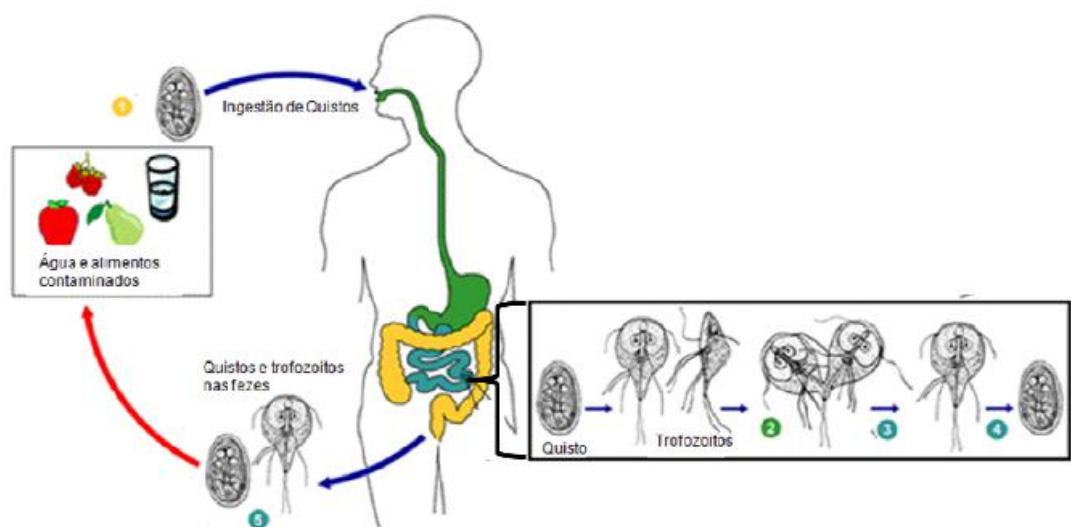


Fig.3 – Ciclo de Vida *Giardia lamblia* (adaptado CDC e Fonseca, 2009)

#### b) *Entamoeba*

*Entamoeba histolytica* é um protozoário unicelular, que tal como a *Giardia*, possui dois estadios distintos – forma de quisto e trofozoíto (Farthing et al, 2009)

A forma infectante, o trofozoíto, apresenta um núcleo único, com um cariossoma central medindo entre 10 a 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro. No intestino, os trofozoítos podem tornar-se comensais, ou patogénicos. (Petri & Singh, 2005) Quando patogénicos, os trofozoitos vão invadir a parede intestinal, alimentando-se de hemácias e células intestinais (Farthing et al, 2009). Em casos graves de infecção crónica dá-se a invasão de outros órgãos, como o fígado, cérebro, pulmões, coração (doença extraintestinal) (Farthing et al, 2009).



Os trofozoítos que se tornam comensais, diminuem o seu ritmo metabólico, armazenam energia e formam uma parede, originando os quistos (Petri & Singh, 2005). Estes medem entre 10 a 15  $\mu\text{m}$ , são arredondados, contêm até quatro núcleos e dividem-se por fissão binária. Na divisão originam quatro novos indivíduos que desenquistam no intestino delgado de um novo hospedeiro (Fig.4) (Petri & Singh, 2005). O modo de transmissão mais comum é a via fecal – oral, ingerindo-se quistos maduros através de água e alimentos contaminados. Contacto sexual oro-anal, também constitui uma via de infecção (Farthing et al, 2009). O mecanismo para que o trofozoíto se torne invasivo ou comensal, não é ainda conhecido, mas pensa-se que poderá ser influenciado por factores como: a estirpe de *E. histolytica*, a interacção com a flora bacteriana intestinal; a imunocompetência do hospedeiro; má nutrição, idade e sexo (Petri & Singh, 2005).

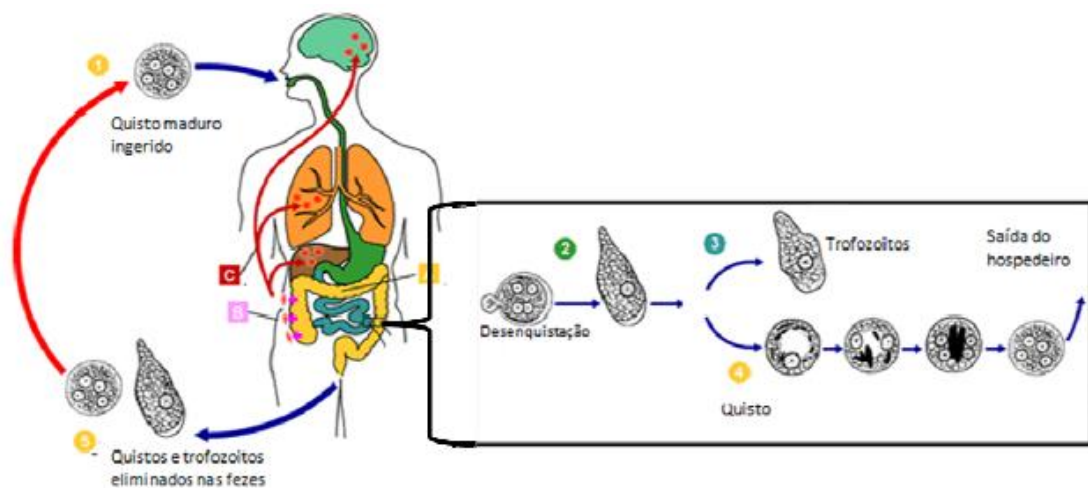


Fig.4 – Ciclo de Vida *E. histolytica* (adaptado CDC e Fonseca, 2009)

## I.4 - Epidemiologia

### a) *Giardia*

As características de *Giardia* influenciam a epidemiologia da infecção, devido ao reduzido número de quistos necessários para infectar o hospedeiro (um a 10 quistos) e à resistência dos quistos no ambiente externo por semanas ou meses. (Cacciò et al 2005)

*G. lamblia* é considerado como o protozoário com maior distribuição mundial, sendo responsável pela doença diarreica em cerca de 200 milhões de indivíduos sintomáticos em todo o mundo. Este protozoário que pode ser encontrado em todos os climas e países infecta uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem que é considerado o seu principal reservatório (Hill & Nash, 2005; Cacciò & Ryan, 2008).

Estima-se que em países desenvolvidos a giardíase tenha uma incidência de 2 a 5% e de 20 a 30% em países em vias de desenvolvimento (Farthing et al, 2009).

Tendo em consideração a via de transmissão fecal - oral do parasita, as condições sanitárias e de higiene precárias favorecem a sua propagação e consequente infecção. Por esse motivo, as regiões em vias de desenvolvimento apresentam os valores de prevalência e incidência mais elevados. A contaminação fecal da água e alimentos contribuem para o aumento do nível de infecções infantis, bem como o risco de infecção para os viajantes internacionais (Hill & Nash, 2005).

Dos viajantes que se deslocam a países em desenvolvimento tropicais e subtropicais, cerca de 25 a 50% destes experienciam episódios diarreicos, sendo os protozoários a causa mais comum para a diarreia crónica (Ekdahl & Andersson, 2005).

Outros grupos de risco para a infecção por *G. lamblia* correspondem aos imunodeprimidos e homossexuais masculinos (Espelage et al 2010).

Nos animais domésticos como cães, gatos, e peridomésticos, gado bovino e ovelhas, este parasita é também frequentemente identificado, sendo por isso uma doença com um grande impacto económico. O papel dos animais na transmissão da giardíase ao homem, permanece pouco claro, mas alguns estudos evidenciam que o maior risco de potencial zoonótico provém dos animais de domésticos (Olson et al 2004; Thompson, 2004).

### *Epidemiologia molecular*

A heterogeneidade genética de *Giardia lamblia* conduziu à formação de sete grupos genéticos ou genótipos distintos (A – G) (Cacciò & Ryan, 2008).

Através de diversos estudos moleculares, observou-se que dos sete grupos genéticos, apenas o A e o B estão associados à infecção em humanos, estando ambos amplamente distribuídos mundialmente. Aparentemente o grupo B é o mais prevalente dos dois. Os restantes grupos estão associados a infecções a outros hospedeiros específicos. C e D foram identificados em Cães, gatos, coiotes e lobos, grupo E em gado, ovelhas, cabras, porcos, e os grupos F e G em gatos e roedores respectivamente (Cacciò & Ryan, 2008).

Tendo em conta a variabilidade das manifestações clínicas da giardíase, segundo Homan e Mank existe uma diferença na patogenicidade entre os genótipos reportados que infectam o Homem – genótipo A e B (Adam, 2001; Homan & Mank, 2001). No seu estudo concluem que existe uma forte correlação entre o tipo de diarreia intermitente, moderada e o genótipo A e entre o genótipo B com os casos de diarreia grave e persistente (Homan & Mank, 2001).

Contudo, os estudos sobre esta possível associação entre uma maior patogenicidade e um grupo genético não são concordantes (Cacciò & Ryan, 2008).

A grande maioria dos estudos de genotipagem usa como genes alvo, *ssurRNA*,  $\beta$ -*giardina* (*bg*), Triose–fosfato isomerase (*tpi*) e Glutamato desidrogenase (*gdh*) (Cacciò et al 2008). O gene *ssurRNA* é utilizado por apresentar uma maior sensibilidade na detecção de DNA de *Giardia*, devido à sua natureza multicópia. Os restantes três genes apresentam um elevado grau de heterogeneidade genética para o género *Giardia* spp permitindo uma melhor diferenciação intragenotípica, ou seja a nível de subgenótipos (Cacciò & Ryan, 2008).

#### *b) Entamoeba*

*E. histolytica* é responsável pela disenteria amebiana que ocorre mundialmente, ainda que com maior incidência nas regiões tropicais e subtropicais. Mais de 500 milhões de pessoas são infectadas, ocorrendo entre 40 000 a 100 000 mortes anualmente, em resultado do desenvolvimento da forma invasiva da doença. Estes valores fazem com que a amebíase seja considerada como a terceira causa de

morte provocada por doenças parasitárias (Tanyuksel & Petri, 2003; Scuhster & Visvesvara, 2004).

Recentemente, a compreensão da distribuição e prevalência, mundial e regional, da infecção por *E. histolytica* tem-se modificado gradualmente devido ao desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram a identificação de três espécies geneticamente distintas: *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*. Estas espécies são morfologicamente idênticas, pelo que a através da microscopia apenas há a possibilidade de identificação do género *Entamoeba*. Esta descoberta é de grande relevância, uma vez que *E. dispar* e *E. moshkovskii* são consideradas como espécies não patogénicas. A abordagem molecular conduziu a uma reavaliação da epidemiologia da amebíase, particularmente no que se refere à prevalência e morbilidade nas regiões endémicas (Fotedar et al 2007).

Actualmente sabe-se que muitos dos 500 milhões de indivíduos infectados por *Entamoeba* correspondem a casos de colonização por *E. dispar* (Stanley, 2003). Dados resultantes de vários estudos epidemiológicos sugerem que a maioria das infecções assintomáticas resultam da colonização pelas espécies não patogénicas, ainda que em algumas regiões a prevalência de *E. histolytica* quer em indivíduos assintomáticos, quer em doentes com diarreia, seja muito elevada (Abd-Alla et al 2000; Ali et al 2008; Singh et al 2009).

Os grupos de risco para a amebíase incluem imigrantes provenientes de países com elevada endemicidade, viajantes para esses mesmos países e homossexuais masculinos. Ao contrário, do que ocorre com a giardíase, as crianças não

correspondem a um grupo de risco pois a amebíase afecta de forma igual adultos e crianças (van Hal et al 2007).

## **I.5 - Características Clínicas**

### *a) Giardia*

A giardíase apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas que dependem de vários factores incluindo a quantidade do inóculo, duração da infecção, factores do hospedeiro e do próprio parasita (Wolfe 1992). O seu período de incubação é de aproximadamente 12 a 20 dias. Como a fase aguda dura apenas alguns dias, a giardíase é comumente confundida com outras patologias como a enterite viral aguda, a disenteria bacilar, intoxicação alimentar, amebíase aguda intestinal ou “diarreia do viajante” (*Escherichia coli* toxigénica) (Garcia, 2001).

A forma mais comum de Giardíase é a infecção assintomática (60-80% dos indivíduos infectados) (Tessier & Davies, 1999; Farthing et al, 2009). Esta ocorre principalmente em zonas de grande endemicidade de *Giardia* embora também ocorra na Europa e América do Norte. Estes indivíduos assintomáticos, não aparentam sofrer quaisquer efeitos prejudiciais por parte do parasita, apesar de não existirem estudos sistemáticos sobre o impacto deste tipo de infecção. Não é claro se a infecção assintomática poderá resultar da contaminação com estirpes não-patogénicas ou se resultará da capacidade do hospedeiro em manter o número de parasitas abaixo do número necessário para provocar sintomatologia (Farthing et al, 2009).

A giardíase aguda tem sido bastante caracterizada em indivíduos que viajam de áreas de baixa para alta endemicidade. Os sintomas podem começar a sentir-se entre

3 – 20 (média 7) dias após chegada a uma área de alto risco, ocorrendo na vasta maioria dos casos a recuperação entre 2 a 4 semanas. Em cerca de 25% dos viajantes a sintomatologia pode persistir até sete ou mais semanas. A diarreia é o sintoma principal sendo usualmente aquosa de início. Subsequentemente tornam-se esteatorréica, frequentemente associada com náuseas, desconforto e inchaço abdominal e perda de peso (Wolfe, 1992; Farthing et al, 2009).

Apesar da maioria das infecções por giardíase serem auto-limitadas, 30-50% dos indivíduos imunocompetentes pode continuar com diarreia persistente, normalmente com características da diarreia esteatorreica. A perda de peso pode ser acentuada, perdendo entre 10 a 20% do peso habitual. Em metade dos doentes com diarreia persistente há evidências de malabsorção de gorduras e outros nutrientes incluindo a vitamina A e B<sub>12</sub>. Vários estudos sugerem que a infecção de giardíase contribui para deficiências no crescimento das crianças (Wolfe, 1992; Gardner & Hill, 2001; Farthing et al, 2009).

Os protocolos terapêuticos existentes recomendam que os doentes devem ser tratados sempre que o parasita seja detectado, independentemente da presença de sintomas. Devido à elevada taxa de re-infecção (até cerca de 90%) em áreas endêmicas, alguns investigadores colocam em causa a utilidade do tratamento nestas mesmas áreas. O tratamento pode variar entre os clínicos e em diferentes locais (Tanyuksel & Petri, 2003; Mohammadi et al 2010).

Vários compostos, como metronidazol e outros derivados de nitroimidazol como o albendazol, mebendazol, furazolidona, tinidazol e ornidazol, são normalmente usados no tratamento da giardíase humana. A linha de tratamento mais comumente

usada é o metronidazol administrado três vezes por dia, durante 3 a 5 dias. O metronidazol é tipicamente administrado em doses de 250 mg para adultos e 15mg/kg para crianças três vezes ao dia por um período de 5 a 7 dias. O albendazol é administrado numa única dose diária de 400mg durante 3 a 5 dias. Nos últimos anos, tem vindo a ser documentada a falha terapêutica do metronidazol (Mohammadi et al 2010).

b) *Entamoeba*

O quadro clínico de infecção intestinal para *E. histolytica* varia desde o estado de portador assintomático, ou colite aguda, até à colite fulminante com perfuração.

A infecção assintomática por *E. histolytica* (80 – 90% dos casos) encontra-se bem documentada. A maioria dos indivíduos elimina a infecção espontaneamente (Stanley, 2003; Farthing et al, 2009).

No estabelecimento da amebíase intestinal manifestam-se sintomas como desconforto abdominal, fezes moles e diarreicas, não necessariamente sanguinolentas ou com muco excessivo. Nos casos mais severos as fezes tornam-se rapidamente sanguinolentas e com muco (Stanley, 2003; Farthing et al, 2009).

A disenteria amebiana aguda deve ser diferenciada da colite bacteriana causada por *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli* enteroinvasiva e enterohemorrágica e *Yersinia enterocolitica* (Farthing et al, 2009).

A colite fulminante é o resultado conjunto da ulceração e necrose do cólon. O quadro clínico é praticamente indistinguível do provocado por uma colite fulminante ulcerativa, o doente apresenta-se febril, mostrando sinais de hipovolémia e



desequilíbrio electrolítico. Apesar da gravidade da doença, as amebas poderão não ser detectadas nas fezes destes doentes (Farthing et al, 2009).

Das manifestações extra-intestinais da amebíase invasiva o abscesso hepático amebiano é mais comum. O período de incubação da amebíase intestinal pode variar bastante, desde alguns dias, a meses e até mesmo anos, mas de uma forma geral ocorre entre uma a quatro semanas. Os abscessos hepáticos podem ser encontrados em todos os grupos etários, mas são dez vezes mais frequentes em adultos que em crianças, e mais frequentes em homens que em mulheres. Encontram-se mais facilmente em populações empobrecidas. Aproximadamente 20% dos pacientes sofreu de disenteria no passado. Cerca de 10% dos pacientes apresenta diarreia ou disenteria, aquando do diagnóstico do abscesso amebiano hepático (Tanyuksel & Petri 2003; Farthing et al, 2009).

Para além do abscesso hepático acima mencionado, outras manifestações extra-intestinais podem verificar-se a nível do trato respiratório, cérebro e coração. Estas complicações devem-se à disseminação dos trofozoítos a partir da mucosa do cólon. (Stanley, 2003)

Utilizam-se duas classes de fármacos para o tratamento das infecções amebianas. Os amebicidas luminais, que actuam no lúmen intestinal não sendo eficazes para o tratamento da amebíase invasiva e os amebicidas teciduais eficientes no tratamento da amebíase invasiva. O tratamento para a amebíase encontra-se descrito na tabela 1 (Farthing et al, 2009).

Tabela.1 – Tratamento para amebíase (Farthing et al, 2009).

Dosagem Adulto		Dosagem Pediátrica (mg/kg dia)
<b>Portador assintomático</b>		
Furuato de diloxanida	500mg x 10 dias	20 (dividas em 3 doses por dia)
Paromomicina	25 – 30 mg/kg em 3 doses por dia em 7 a 10 dias	25 – 30 (divididas em 3 doses em 7 a 10 dias)
Iodoquinol	650 mg durante 20 dias	20 – 40 (divididas em 3 doses durante 20 dias)
<b>Infecção intestinal</b>		
Metronidazol seguido por	750 – 800 mg durante 10 dias	35 – 50 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Furuato de diloxanida*	500 mg durante 10 dias	20 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Tinidazol seguido por	2 gr/dia durante 2 a 3 dias	50 – 60 (durante 3 dias)
Furuato de diloxanida*	500 mg durante 10 dias	20 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Paramomicina	25 – 30 mg/kg em 3 doses diárias durante 7 a 10 dias	25 – 30 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Nitazoxanida	500 mg durante 3 dias	100 – 200 mg durante 3 dias, dependendo do tamanho.
<b>Abcesso hepático amebiano</b>		
Metronidazol seguido por	750-800 mg durante 10 dias	35-50 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Furuato de diloxanida*	500 mg durante 10 dias	20 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Tinidazol seguido por	2g/dia durante 3 a 5 dias	20 (dividido em 3 doses durante 10 dias)
Furuato de diloxanida*	500 mg durante 10 dias	50 – 60 (durante 5 dias)
Desidroemetina seguida por	1-1,5 mg/kg(máximo 90mg/dia) intravenoso durante 5 dias	1 (durante 10 dias no máximo)
Furuato de diloxanida	500 mg durante 10 dias	20 (dividido em 3 doses durante 10 dias)

\*Paromicina ou o iodoquinol podem ser usados em alternativa ao Furuato de diloxanida.

## I.6 - Diagnóstico

### a.1) *Giardia* - Microscopia

O diagnóstico da giardíase é realizado através da identificação de quistos ou trofozoítos em amostras de fezes. Como a eliminação dos quistos e trofozoítos é intermitente é recomendado a análise de três amostras num período de uma a duas semanas (Hill 1993; Farthing et al, 2009).

Embora os trofozoítos e quistos possam ser observados directamente numa preparação salina, técnicas de concentração de quistos nas fezes (usando formol-éter ou sulfato de zinco) facilitam a observação destas estruturas (Hill & Nash, 2005).

Verificou-se que a sensibilidade do exame microscópico é de 50-70% quando se observa apenas uma amostra de fezes e que essa sensibilidade aumenta para 90% quando se analisam três amostras (Walterspiel & Pickering 1994). Mas a inexperiência do técnico e baixa parasitémia contribuem para uma diminuição da sensibilidade no diagnóstico microscópico (Hove et al 2009).

### a.2) *Giardia* – Testes imunológicos

A imunodeteção de *Giardia* pode ser realizada de duas formas, detecção de antígenos ou detecção de anticorpos específicos de *Giardia*. Para o primeiro caso, os testes de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e imunofluorescência directa ou indirecta são usados para detectar antígenos solúveis presentes nas fezes. Estas metodologias têm demonstrado, ser bastantes sensíveis e específicas podendo variar entre os 90 e 99%, e 95 a 100% respectivamente, quando comparadas com a microscopia (Garcia, 2001; Kucik et al 2002).

Os testes serológicos, procuram detectar as Imunoglobulinas anti-*Giardia* IgG , IgM e IgA no soro dos doentes. Contudo a detecção destes anticorpos no soro não é ainda uma técnica que contribua para o diagnóstico de giardíase, faltando os critérios necessários para um uso clínico comercial (Garcia, 2001).

No caso de detecção de IgG anti-*Giardia* para indivíduos que habitem em áreas endémicas, estes testes não permitem distinguir de uma infecção recente ou passada, devido muito provavelmente à sucessiva exposição ao protozoário. As IgM específicas de anti-*Giardia* normalmente encontram-se em elevadas concentrações em hospedeiros com uma infecção recente, mas diminui bruscamente após esta passar (Katz & Taylor 2001; Farthing et al, 2009).

### *a.3) Giardia – Diagnóstico molecular e Genotipagem*

Embora as técnicas de microscopia e imunologia possam ser usadas para identificar o parasita *G. lamblia*, estas podem não ser sensíveis o suficiente, pois falham na detecção quando se apresenta um baixo número de quistos a serem eliminados pelos hospedeiros, além de não permitirem a diferenciação dos diferentes genótipos do protozoário. Devido a estas limitações foram desenvolvidas técnicas biologia molecular, nomeadamente a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção e caracterização genotípica de *Giardia* (Nantavisai et al 2007).

A PCR possui uma alta especificidade e ao mesmo tempo uma alta sensibilidade (Gosh et al 2000).

Esta ferramenta de caracterização molecular tornou-se muito importante pois tem contribuído para a compreensão da patogenicidade e a variedade de hospedeiros de *Giardia*. Apesar da elevada similaridade morfológica do parasita, diversos estudos permitiram revelar um elevado nível de heterogeneidade genética (Adam, 2001).

Contudo, estudos recentes baseados numa abordagem *multilocus* demonstraram que um número de isolados, tanto de origem animal ou humana, não podem ser designados inequivocamente para um determinado genótipo. A atribuição do genótipo B pode ser por vezes problemática, dado o seu elevado grau de heterogeneidade genética. Os isolados só podem ser integrados num determinado grupo quando se combinam os polimorfismos dos três *loci* (*bg*, *gdh* e *tpi*) (Plutzer et al 2010).

#### *b.1) Entamoeba* - Microscopia

O exame microscópico para *Entamoeba* é realizado recorrendo a técnicas de concentração e coloração, sendo realizado em duas etapas. A microscopia directa onde se mistura uma pequena quantidade de amostra em uma solução de cloreto de sódio para detectar trofozoítos móveis de *Entamoeba histolytica/díspar/moshkovskii* e fornecer informações sobre o conteúdo das fezes (presença de leucócitos de eritrócitos) (Singh et al 2009).

Na segunda etapa a amostra de fezes é então corada com tricómio e ou iodo para identificar os trofozoitos e quistos (Singh et al 2009).

São necessárias três amostras de fezes negativas, para que se possa indicar que não existe infecção amebiana (Li & Stanley, 1996).

A sensibilidade do exame microscópico é inferior a 60% e por vezes induz em resultados enganadores devido a erros na identificação de outras estruturas, como macrófagos e células polimorfonucleares (Singh et al 2009).

O diagnóstico microscópico de *Entamoeba* não permite distinguir *E. histolytica* dos parasitas mais comuns *E. dispar* e *E. moshkovskii*. É assim determinante para um correcto diagnóstico a complementação com métodos mais modernos no diagnóstico da amebíase (Singh et al 2009).

#### *b.2) Entamoeba – Testes imunológicos*

A combinação da serologia com os testes de antígeno às fezes possuem uma maior especificidade e sensibilidade quando comparados com a microscopia no diagnóstico da infecção por *E. histolytica* (Pillai et al 1999).

Os exames serológicos são positivos no momento de apresentação clínica da amebíase em 60 a 90% dos casos, sendo os testes de eleição, o teste imunofluorescência indirecta para anticorpos (IFAT), imunoelectroforese reversa (CIEP) e testes de ELISA.

Como já referido anteriormente, o exame microscópico não permite distinguir as espécies dentro do género *Entamoeba*. Devido a esta limitação, recentemente têm sido desenvolvidos vários testes rápidos para a detecção de antígeno usados comercialmente para o diagnóstico e distinção das espécies (Haque et al 2000; Haque & Petri, 2006).

Relativamente a este tipo de testes alguns como o TechLab *E. histolytica* II são específicos para a detecção de *E. histolytica* e aparentam ser um teste com sensibilidade e especificidade superior (van Doorn et al 2005; Leo et al 2006).

Os testes de detecção de anticorpos são específicos mas possuem sensibilidade variáveis, dependendo da presença ou ausência e do tipo de doença amebiana invasiva. A sensibilidade da serologia aproxima-se dos 95% para o abscesso meabiano hepático e dos 84% para a doença intestinal invasiva. Para diagnosticar portadores assintomáticos de *E. histolytica*, o teste por detecção de anticorpos apresenta uma sensibilidade de apenas 8%, sendo por isso inútil.

Um teste positivo confirma a suspeita de doença amebiana invasiva desde que o paciente não tenha contraído a doença num passado recente, pois os títulos de anticorpos podem permanecer elevados durante anos após tratamento bem-sucedido (van Hal et al 2007).

### b.3) *Entamoeba* – Diagnóstico molecular

A utilização do PCR convencional para o diagnóstico de *E. histolytica* teve início na década de 90 (Tannich & Burchard, 1991).

Esta metodologia tem demonstrado ser altamente específica e sensível na detecção de DNA parasitário a partir de amostras microscopicamente positivas, e têm sido reportada como sendo 100 vezes mais sensível que os testes ELISA actualmente disponíveis (Fotedar et al 2007; Singh et al 2009).

A técnica de PCR pode ser realizada a partir de vários tipos de amostras biológicas, como fezes, tecidos e aspirados de abscessos hepáticos (Tanyuksel & Petri, 2003).

Presentemente, existe uma grande variedade de métodos de PCR para a detecção e diferenciação das três espécies de *Entamoeba*, baseados em diferentes genes alvo. O gene 18S rDNA (pequena sub-unidade ribossomal) é o alvo mais comumente utilizado para a amplificação e diferenciação das espécies de *Entamoeba*. A escolha deste gene deve-se ao facto de apresentar uma diversidade genética consistente para a detecção entre de *E. histolytica* e *E. dispar* (Clark & Diamond, 1991; Clark & Diamond, 1992; Cruz-Reyes et al 1992). Para além disso o seu carácter multicópia contribui para uma maior facilidade na sua detecção (Fotedar et al, 2007).

Ali e Parija desenvolveram técnicas de PCR para a detecção de *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii* directamente a partir de amostras de fezes. Contudo esta metodologia implica a detecção de cada uma das espécies por reacções de *nested*-PCR individuais o que é fastidioso (Ali et al 2003; Parija & Khairnar, 2005). Para ultrapassar esta limitação Khairnar e Parija desenvolveram um *nested*-PCR multiplex, através do qual é possível detectar e diferenciar em simultâneo de *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii* (Khairnar & Parija 2007).

Em estudos anteriores, a utilização de *nested's*-PCR *multiplex* permitiu um aumento da sensibilidade e especificidade de 94 e 100%, respectivamente (Nunez et al 2001).



A distinção molecular entre as espécies patogénicas e não patogénicas torna-se importante em relação ao tratamento para evitar o uso desnecessário de fármacos (Khairnar & Parija 2007).

## II. - Objectivos

### II. 1 - Objectivos gerais

Investigar a contribuição dos métodos moleculares na detecção do protozoário intestinal *Giardia lamblia* .

Investigar a contribuição dos métodos moleculares na detecção do protozoário intestinal *Entamoeba* spp.

### II.2 - Objectivos específicos

1. Comparação da eficiência e custo-benefício da extracção de DNA de fezes conservadas a -20°C e em papel de filtro para a detecção de protozoários intestinais.
2. Avaliar a viabilidade da utilização do papel de filtro como meio de conservação para amostras fecais decalcadas, através da comparação com o método tradicional de conservação, congelamento a -20°C.
3. Detectar e identificar, através de técnicas moleculares, as espécies *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* e *Entamoeba moshkovskii* detectadas nas fezes recebidas no laboratório de Patologia Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa (IHMT).
4. Detectar e identificar, através de técnicas moleculares a espécie *Giardia lamblia* detectadas nas fezes recebidas no laboratório de Patologia Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa (IHMT).

5. Caracterizar genotipicamente os diferentes isolados de *G. lamblia* através de análise filogenética (simples e concatenada) e polimorfismos de posição em três *loci* genéticos distintos (*bg*, *tpi* e *gdh*).

### III. - Materiais e Métodos

#### III.1 - Origem das amostras

Neste estudo foram utilizadas de um total de 704 amostras recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal), entre Setembro de 2007 e Agosto de 2009, para pesquisa de quistos/ovos de parasitas, 80 amostras provenientes de suspeita clínica (n=55) ou microscopia positiva para os protozoários intestinais *Giardia* (n=19) e *Entamoeba* (n=22). As amostras são provenientes de indivíduos de nacionalidade Portuguesa ou estrangeira, com ou sem estadia prévia em Países Tropicais (Tabela 2).

Tabela 2 – Amostras analisadas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT, por país de origem e respectiva estadia em país Tropical (n=80)

País de Origem	Estadia prévia em país Tropical (diferente do país de origem)		
	Sim	Não	Total
Portugal	3	11	14
Brasil	0	1	1
República Democrática do Congo	3	0	3
Somália	0	5	5
Sri-Lanka	0	1	1
Colômbia	0	1	1
Eritreia	1	0	1
Guiné-Conacri	0	2	2
Iraque	0	1	1
Paquistão	1	0	1
Desconhecido	17	33	50
Total	25	55	80

### **III.2 - Conservação das amostras**

Para cada amostra recebida conservou-se uma porção a -20°C e efectuou-se o decalque da mesma em papel de filtro (*Generation® Blood Collection Card*, Qiagen), que foi também conservado a -20°C, com excepção de 13 amostras nas quais se descongelou as fezes e se efectuou o decalque em papel de filtro, seguido de nova conservação a -20°C.

### **III.3 - Exame Parasitológico**

Todas as amostras recebidas foram observadas ao microscópio óptico para a pesquisa de quistos/ovos de parasitas, recorrendo a técnicas de concentração e de coloração. (WHO, 1994) Realizou-se inicialmente o exame directo em soro fisiológico, e posteriormente a técnica de Ritchie para concentração de quistos/ovos. Para observação microscópica usou-se a coloração com Solução de lugol ou soro fisiológico.

### **III.4 - Extracção de DNA**

Nas amostras de fezes conservadas a -20°C procedeu-se à extracção utilizando o kit comercial *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, com excepção de nove amostras nas quais o volume final de eluição foi de 25µl.

As amostras decalcadas em papel de filtro foram extraídas a partir de uma adaptação ao protocolo originalmente desenvolvido para a extracção de DNA de amostras de sangue (PF) (*Generation® Capture Card Kit*, Qiagen). As adaptações ao

protocolo original implicaram a triplicação dos volumes de solução utilizadas, com excepção do último passo no qual se manteve o volume final de eluição. (Ferreira, 2009; Fonseca, 2009) Tal como para o método de extracção anterior, também para 13 amostras conservadas em papel de filtro se repetiu a extracção com volume final de eluição de 25µl.

Para ambas as técnicas foram incluídos controlos negativos de extracção.

### III.5 - Amplificação de DNA

a) Para confirmação do sucesso das extracções foi realizada a amplificação de um fragmento de 305pb do gene 18S humano, segundo as condições descritas por Parija & Khairnar (2007), recorrendo a um *PCR nested*, utilizando nas 2 reacções de amplificação os primers IAC1 e IAC2, de acordo com as condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de amplificação utilizadas para o gene humano 18S

Primers	Concentração primers	Volume DNA	Volume Final	Condições de amplificação
IAC1/IAC2	5pmol	2,5µl	25µl	96°C; 2' (30 ciclos) 92°C 1' 56°C 1' e 72°C 90'', 72°C 7'

b) A detecção e diferenciação molecular das espécies *E.histolytica*, *E.dispar* e *E. moshkovskii* foram efectuadas através de um PCR nested multiplex possuindo como alvo de amplificação o gene 16S rRNA.

Na primeira reacção utilizou-se os primers E1 e E2, que amplificam uma região comum ao género *Entamoeba spp.* e na segunda reacção introduziu-se os primers específicos para diferenciação das espécies, originando fragmentos

com diferentes tamanhos Eh1/Eh2 – 439pb, Ed1/Ed2 – 174pb e Em1/Em2 – 553pb (Khairnar et al 2007).

Tabela 4 – Condições de amplificação utilizadas para a detecção de *Entamoeba* spp

Primers	Concentração primers	Volume DNA	Volume Final	Condições de amplificação
E1/E2	10pmol	2,5µl	25µl	96°C; 2' (30 ciclos) 92°C 1' 56°C 1' e 72°C 90'', 72°C 7'
Eh1/Eh2; Ed1/Ed2; Em1/Em2	10pmol	2,5µl	25µl	96°C; 2' (40 ciclos) 92°C 1' 48°C 1' e 72°C 90'', 72°C 7'

c) Para detecção e identificação molecular de *Giardia lamblia* realizou-se um nested PCR de acordo com Read et al (2002) em que se amplificou uma região do gene *ssurRNA* com 175pb. Na primeira reacção utilizaram-se os primers RH11 e RH4 e na segunda GiarF e GiarR.

Posteriormente para as amostras amplificadas para o gene *ssurRNA* realizaram-se amplificações para os genes de *Giardia lamblia*  $\beta$ -*giardina* (*bg*) *a*, *triose-fosfato isomerase* (*tpi*) e *glutamato desidrogenase* (*gdh*) através de *nested* PCR.

A amplificação do gene *bg* foi realizada segundo Lalle et al (2005) com as modificações indicadas na tabela 5 através de um *nested* PCR, originando um produto de amplificação com 511pb tendo sido usados para a 1ª reacção os primers G7/G759 e para a segunda G8/G9.

Para o gene *tpi* realizou-se um nested PCR, baseadas nas condições propostas por Sulaiman et al (2003) alterando a temperatura de *annealling* da 2ª reacção para 55°C como descrito na tabela 5. Foi originado um fragmento

com 530 pb, tendo sido usados como primers para a primeira reacção AL3543/AL3546 e para a segunda AL3544/AL3545.

Em relação ao gene *gdh* recorreu-se a um PCR com duas reacções com condições de amplificação idênticas produzindo um produto de amplificação de 530 pb. As condições foram optimizadas seguindo as especificações de Cacciò et al (2008) tabela 5 sendo usados como primers para a primeira reacção GDH1/GDH2 e na segunda GDH3/GDH4.

Tabela 5 – Condições de amplificação utilizadas para os genes *ssurRNA*, *bg*, *tpi* e *gdh* de *Giardia lamblia*

Primers	Concentração primers	Volume DNA	Volume Final	Condições de amplificação
<b>RH11/RH4</b>	12,5pmol	2µl	25µl	96°C; 5' (35 ciclos) 96°C 30'' 55°C 30'' e 72°C 45'', 72°C 7'
<b>GiarF/GiarR</b>	12,5pmol	2µl	25µl	96°C; 5' (35 ciclos) 96°C 30'' 55°C 30'' e 72°C 45'', 72°C 7'
<b>G7/G759</b>	10pmol	2µl	25µl	95°C; 15' (35 ciclos) 95°C 30'' 60°C 30'' e 72°C 1', 72°C 7'
<b>G8/G9</b>	10pmol	2µl	25µl	95°C; 15' (35 ciclos) 95°C 30'' 55°C 30'' e 72°C 1', 72°C 7'
<b>AL3543/AL3546</b>	10pmol	2µl	25µl	94°C; 5' (35 ciclos) 94°C 45'' 50°C 45'' e 72°C 1', 72°C 10'
<b>AL3544/AL3545</b>	10pmol	2µl	25µl	94°C; 5' (35 ciclos) 94°C 45'' 55°C 45'' e 72°C 1', 72°C 10'
<b>GDH1/GDH2</b>	10pmol	2µl	25µl	94°C; 2' (40 ciclos) 94°C 30'' 55°C 30'' e 72°C 1', 72°C 10'
<b>GDH3/GDH4</b>	10pmol	2µl	25µl	94°C; 2' (35 ciclos) 94°C 30'' 55°C 30'' e 72°C 1', 72°C 10'

Para cada reacção de amplificação foram incluídos os respectivos DNA de controlo positivo: para *G. lamblia* (*ssurRNA*, *bg*, *tpi* e *gdh*) incluiu-se DNA da estirpe de referência *Portland-1*, (ATCC 30888DTM LGC Promochem), utilizou-se DNA de controlo humano e para *E.histolytica/dispar/moshkovskii* (16S rRNA) usaram-se os controlos generosamente cedidos por Graham Clark, *London School of Hygiene and Tropical Medicine* para cada espécie de *Entamoeba*.



Adicionalmente, foram também incluídos em todas as reacções de amplificação controlos negativos de reacção (*no template*) e os controlos negativos de extracção.

Todas as reacções de amplificação foram efectuadas utilizando o *kit “PCR ready to go DNA beads”* (GE Health Care), e os produtos amplificados foram visualizados em luz UV, após electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

### **III.6 - Sequenciação de DNA**

Os produtos de amplificação para os fragmentos dos genes de *G. lamblia* ( $\beta$ -*giardina*, *tpi* e *gdh*) foram purificados com recurso ao *kit* de purificação *JETquick®Gel Extraction Spin Kit* (Genomed) e *kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE healthcare) seguindo as instruções do fabricante com excepção do volume de eluição de DNA para o primeiro *kit* (30 $\mu$ l)

Subsequentemente, os produtos purificados foram enviados para sequenciação na empresa STAB VIDA, a fim de serem sequenciados em ambas as direcções com os primers G8/G9 para  $\beta$ -giardina, AL3544/AL3545 para *tpi* e GDH3/GDH4 para o gene *gdh*.

### **III.7 - Análise filogenética e Caracterização molecular**

Para a determinação do genótipo de cada amostra, as sequências obtidas neste estudo, foram alinhadas com sequências de referência para *G.lamblia* publicadas no GenBank<sup>TM</sup>, utilizando o software ClustalW.

Foi também efectuada a análise dos polimorfismos de posição (*single nucleotid polymorphism* – SNP) de acordo com os dados publicados por Cacciò et al. (2008).

Para a análise filogenética utilizaram-se os múltiplos alinhamentos analisados pelo ClustalW no programa MEGA, versão 4 (Tamura et al, 2007). Para sete isolados juntaram-se as três sequências obtidas para os genes *bg*, *tpi* e *gdh* e realizou-se também o alinhamento múltiplo (análise concatenada). A análise foi elaborada utilizando-se a estimativa da distância de Kimura a dois-parâmetros, e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. A topologia da árvore foi comparada por *bootstraping* usando 1000 replicados aleatórios das sequências originais.

Como grupo externo (*outgroup*) para a elaboração das árvores filogenéticas utilizaram-se as sequências de *Giardia muris* (EF455599) para *bg* e *Giardia ardae* (AF069564 e AF069060) para os genes *tpi* e *gdh* respectivamente. Foram incluídas igualmente as sequências de referência para *G.lamblia* publicadas no GenbankTM.

## IV. - Resultados

### IV.1 - Microscopia

Das 80 amostras analisadas neste estudo 27 eram suspeitas clínicas de giardíase e 28 de amebíase (uma das amostras possuía suspeita para *Giardia* e *Entamoeba*), as restantes possuíam suspeita para outras patologias intestinais. Destas, obteve-se a confirmação microscópica da presença de quistos de *Giardia* em 6 e de *Entamoeba* em 7 amostras. Adicionalmente, detectaram-se 12 amostras microscopicamente positivas para *Giardia* e 15 para *Entamoeba* para as quais não havia qualquer indicação clínica para ambas as patologias. Ocorreu ainda o caso de uma amostra com suspeita clínica de amebíase ter sido diagnosticada para *Giardia* pela microscopia e outra com suspeita de giardíase diagnosticada para *Entamoeba* spp., como indicado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado da análise parasitológica em amostras de fezes com suspeita clínica de Parasitoses intestinais recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT e respectiva microscopia (n=80)

	Susp. Clínica	Microscopia positiva	
		<i>Giardia</i> sp.	<i>Entamoeba</i> spp.
<b>Giardíase</b>	27*	6	1
<b>Amebíase</b>	28*	1	7
<b>Outras Patologias intestinais</b>	26	12	14
<b>Total</b>	80*	19	22

\*O total seria 81 amostras com suspeita clínica, dado que uma das amostras possuía suspeita para *Giardia* e *Entamoeba* spp.

Relativamente à origem geográfica dos doentes positivos para *Giardia* (n= 19) apenas quatro indivíduos eram de naturalidade Portuguesa e sem estadia prévia em país tropical. Cinco indivíduos eram originários de diferentes países, como Guiné-Conacri, Somália, Iraque, Paquistão e República Democrática do Congo (R.D.C.). Estes

dois últimos permaneceram em país Tropical, Irão e Tanzânia respectivamente. Relativamente aos restantes dez indivíduos, desconhecia-se o país de origem, havendo apenas um com estadia em país tropical, neste caso o Mali. (Tabela 7)

No que se refere aos doentes com microscopia positiva para *Entamoeba* spp. (n=22) desconhecia-se o país de origem para a maioria (n=13). Contudo, quatro destes indivíduos apresentaram estadia em diferentes países tropicais, tais como Angola e Moçambique. Apenas dois possuem naturalidade portuguesa, havendo um destes com estadia em vários países tropicais. Os restantes sete indivíduos provêm de diferentes países, como Somália, Sri-Lanka, Colômbia, R.D.C., Eritreia e Guiné-Conacri. Destes os indivíduos provenientes da R.D.C. e da Eritreia passaram por Benim, Mali, Senegal e Etiópia, Sudão e Senegal respectivamente. (Tabela 7)

**Tabela 7.** Amostras de fezes analisadas neste estudo (n=80).

Isolado	País de origem	Estadia em país tropical (diferente do país de origem)	Suspeita Clínica	Resultado Microscopia
16	d*	N/A		<i>Entamoeba</i> spp
34	d*	N/A	Giardiase	<i>Giardia</i>
37	d*	N/A	Amebíase	Negativo
60	Guiné-Conacri	N/A		<i>Giardia</i>
65	Somália	N/A		<i>Giardia</i>
66	Brasil	N/A	Amebíase	Negativo
70	Somália	N/A		<i>Entamoeba</i> spp
91	Somália	N/A	Amebíase	Negativo
94	d*	N/A		<i>Giardia</i>
98	d*	India	Amebíase	Negativo
102	Portugal	África do Sul	Amebíase	Negativo
103	d*	Angola		<i>Entamoeba</i> spp
107	Portugal	N/A	Giardiase	<i>Giardia</i>

<b>Isolado</b>	<b>País de origem</b>	<b>Estadia em país tropical (diferente do país de origem)</b>	<b>Suspeita Clínica</b>	<b>Resultado Microscopia</b>
<b>112</b>	d*	N/A	Giardíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>116</b>	d*	Mali	Giardíase	<b><i>Giardia</i></b>
<b>117</b>	Sri-Lanka	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>120</b>	Colômbia	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>122</b>	Portugal	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>125</b>	d*	Angola	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>126</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b><i>Giardia</i></b>
<b>133</b>	d*	Venezuela	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>134</b>	Somália	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>135</b>	d*	Venezuela	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>139</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b><i>Giardia</i></b>
<b>150</b>	d*	Angola	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>151</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>152</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>negativo</b>
<b>153</b>	Iraque	N/A		<b><i>Giardia</i></b>
<b>154</b>	d*	Angola	Giardíase e Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>155</b>	d*	Guiné-Conacri	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>156</b>	d*	República Dominicana	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>157</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>158</b>	d*	Cabo Verde	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>159</b>	R.D.C.	Benim, Mali e Senegal		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>161</b>	Portugal	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>162</b>	Portugal	Vários		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>165</b>	d*	Moçambique	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>166</b>	R.D.C.	Angola	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>167</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>168</b>	Portugal	N/A	Amebíase	<b><i>Giardia</i></b>
<b>169</b>	Portugal	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>

<b>Isolado</b>	<b>País de origem</b>	<b>Estadia em país tropical (diferente do país de origem)</b>	<b>Suspeita Clínica</b>	<b>Resultado</b>
				<b>Microscopia</b>
<b>170</b>	Somália	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>171</b>	Portugal	Vários	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>173</b>	d*	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>175</b>	d*	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>176</b>	d*	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>177</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>178</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>179</b>	d*	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>180</b>	Eritreia	Etiópia, Sudão e Senegal	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>181</b>	Guiné-Conacri	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>182</b>	Portugal	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>183</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>184</b>	d*	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>185</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>186</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>187</b>	d*	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>188</b>	d*	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>189</b>	d*	N/A		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>190</b>	d*	Moçambique		<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>191</b>	d*	N/A	Giardíase	<b><i>Giardia</i></b>
<b>192</b>	d*	Angola	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>193</b>	d*	N/A	Amebíase	<b>Negativo</b>
<b>194</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>195</b>	d*	N/A	Giardíase	<b>Negativo</b>
<b>196</b>	d*	N/A	Amebíase	<b><i>Entamoeba spp</i></b>
<b>198</b>	d*	N/A		<b><i>Giardia</i></b>
<b>200</b>	d*	N/A		<b><i>Giardia</i></b>
<b>205</b>	d*	N/A		<b><i>Giardia</i></b>
<b>206</b>	d*	N/A		<b><i>Giardia</i></b>

Isolado	País de origem	Estadia em país tropical (diferente do país de origem)	Suspeita Clínica	Resultado
				Microscopia
207	d*	N/A	Giardíase	Negativo
208	d*	N/A		<i>Giardia</i>
209	d*	República Dominicana	Amebíase	Negativo
210	d*	N/A	Giardíase	Negativo
212	d*	Angola	Giardíase	Negativo
213	d*	N/A		<i>Entamoeba spp</i>
214	Paquistão	Irão		<i>Giardia</i>
215	d*	Angola		<i>Entamoeba spp</i>
216	d*	N/A		<i>Giardia</i>
217	R.D.C.	Tanzânia		<i>Giardia</i>

d\* - Desconhecido

N/A – Não aplicável

#### ***IV.2 - Comparação da eficácia dos métodos de extracção de DNA a partir de fezes conservadas a -20°C e em papel de filtro***

Com o objectivo de se testar a eficácia da extracção de DNA a partir das amostras conservadas em papel de filtro pelo método adaptado *Generation® Capture Card Kit, Qiagen* (GQ), efectuou-se a comparação desta metodologia com a extracção de fezes conservadas a -20°C utilizando o *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (kitQ). Para tal, foram utilizadas 62 amostras fecais, 19 isolados microscopicamente positivos para *Giardia* e 18 negativos e 14 isolados microscopicamente positivos para *Entamoeba spp.* e 11 negativos (Tabela 10)

Nesta análise comparativa apenas foram utilizadas 62 amostras devido ao esgotamento de material biológico inviabilizando a realização do procedimento experimental de ambos os métodos de extracção KitQ e GQ.

a) *Giardia*

Das amostras microscopicamente positivas para *G. lamblia* (n=19) conservadas em papel de filtro utilizando o método GQ, 8 amostras foram decalcadas após descongelamento do material biológico e as restantes 11 a fresco. Em cinco destas amostras decalcadas após descongelamento não foi possível efectuar a reacção de amplificação por PCR por se tratar de amostras muito antigas, passando a n=14 o número de amostras utilizadas para esta comparação.

Em 92,9% (13/14) das amostras decalcadas conseguiu-se amplificar DNA de *Giardia*. (Tabela 8)

Estas amostras foram descongeladas e só depois decalcadas pois tratam-se das amostras conservadas a -20°C no Laboratório de Patologia Tropical, do IHMT, Lisboa, e no âmbito do projecto “Identificação de genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de animais domésticos e do Homem” (Ferreira, 2010) microscopicamente positivas para *Giardia*. Dado que as amostras com microscopia positiva eram em número reduzido, resolveu-se utilizar também estas amostras.

Relativamente à comparação entre as amostras conservadas em papel de filtro e o KitQ, observou-se que em somente uma amostra da extracção por GQ não houve amplificação por PCR do DNA de *Giardia*, tendo ocorrido amplificação em todas as amostras extraídas pelo kitQ. (Tabela 8)



b) *Entamoeba* spp

Para as amostras microscopicamente positivas para *Entamoeba* spp. (n=14), 5 destas amostras foram decalcadas após descongelamento do material biológico e as restantes 9 a fresco. Foi amplificado com sucesso por PCR o fragmento do gene *16S rRNA* em 57,1% (8/14) das amostras extraídas com ambos os métodos de extracção (kitQ e GQ), não se tendo verificado qualquer diferença entre as amostras (Tabela 9).

Quanto às amostras microscopicamente negativas tanto para *G. lamblia* (n=18) como para *Entamoeba* spp. (n=10), ambos os métodos de extracção apresentam valores iguais na detecção por PCR. (Tabela 8 e 9)

**Tabela 8.** Amostras fecais para pesquisa de *G. lamblia* conservadas a -20°C (Kit) e decalcadas em papel de filtro (PF), frescas (n=11) e após descongelamento (n=4).

<i>Giardia</i>	Mic+ (n=14)		Mic- (n=18)	
Extracção	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-
KitQ	<b>100%</b> (14/14)	<b>0%</b> (0/11)	<b>0%</b> (0/18)	<b>100%</b> (18/18)
GQ	<b>92,9%</b> (13/14)	<b>7,1%</b> (1/14)	<b>0%</b> (0/18)	<b>100%</b> (18/18)

PCR+ - amostras onde ocorreu amplificação por PCR para o gene alvo

PCR- - amostras onde não houve amplificação por PCR para o gene alvo

**Tabela 9.** Amostras fecais para pesquisa de *Entamoeba* spp. conservadas a -20°C (Kit) e decalcadas em papel de filtro a fresco (n=9) e após descongelamento (n=5).

<i>Entamoeba</i>	Mic+ (n=14)		Mic- (n=11)	
Extracção	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-
KitQ	<b>57,1%</b> (8/14)	<b>42,9%</b> (6/14)	<b>0%</b> (0/11)	<b>100%</b> (11/11)
GQ	<b>57,1%</b> (8/14)	<b>42,9%</b> (6/14)	<b>0%</b> (0/11)	<b>100%</b> (11/11)

PCR+ - amostras onde ocorreu amplificação por PCR para o gene alvo

PCR- - amostras onde não houve amplificação por PCR para o gene alvo

Tabela 10 – Amostras utilizadas na comparação de métodos de extracção kitQ e GQ.

Amostras	Mic +	PCR/Extracção		Amostras	Mic -	PCR/Extracção	
		GQ	kitQ			GQ	kitQ
107 (G)	+	+	+	98 (E)	-	-	-
112 (E)	+	+	+	102 (E)	-	-	-
117 (E)	+	-	-	125 (E)	-	-	-
120 (E)	+	+	+	151 (G)	-	-	-
122 (E)	+	+	+	152 (G)	-	-	-
126 (G)	+	+	+	154 (G)	-	-	-
134 (E)	+	+	+	156 (G)	-	-	-
139 (G)	+	+	+	157 (G)	-	-	-
153 (G)	+	+	+	158 (G)	-	-	-
168 (G)	+	+	+	161 (E)	-	-	-
180 (E)	+	-	-	165 (G)	-	-	-
181 (E)	+	+	+	167 (G)	-	-	-
184 (E)	+	+	+	169 (E)	-	-	-
187 (E)	+	+	+	170 (E)	-	-	-
189 (E)	+	-	-	171 (G)	-	-	-
190 (E)	+	-	-	177 (G)	-	-	-
191 (G)	+	+	+	178 (G)	-	-	-
196 (E)	+	+	+	179 (E)	-	-	-
198 (G)	+	-	+	182 (G)	-	-	-
200 (G)	+	+	+	185 (G)	-	-	-
205 (G)	+	+	+	188 (E)	-	-	-
206 (G)	+	+	+	192 (E)	-	-	-
208 (G)	+	+	+	193 (E)	-	-	-
213 (E)	+	-	-	194 (G)	-	-	-
214 (G)	+	+	+	195 (G)	-	-	-

Amostras	Mic +	PCR/Extracção		Amostras	Mic -	PCR/Extracção	
		GQ	kitQ			GQ	kitQ
215 (E)	+	-	-	207 (G)	-	-	-
216 (G)	+	+	+	209 (E)	-	-	-
217 (G)	+	+	+	210 (G)	-	-	-
				212 (G)	-	-	-

(G) – amostra de *Giardia*

(E) – amostra de *Entamoeba spp*

#### ***IV.3 - Comparação do custo , duração e equipamento dos métodos de extracção de DNA a partir de fezes conservadas a -20°C e em papel de filtro***

Em relação aos custos da extracção de DNA por amostra verifica-se que o custo associado à extracção pelo GQ é inferior ao do KitQ, em cerca de 2,2€/amostra. Relativamente à duração do procedimento de cada protocolo, a extracção de DNA de 12 amostras utilizando o kitQ tem uma duração de cerca de 3 horas enquanto utilizando o método GQ a duração de extracção é de uma hora e meia. Comparativamente aos equipamentos necessários para as extracções, o investimento inicial para a extracção por GQ tem um custo inferior e requer menos material que a extracção por kitQ em cerca de 1323,0 €. (Tabelas 11, 12 e 13)

Tabela 11– Custos e materiais utilizados na extracção pelo Kit Qiagen, por amostra

Reagente/Material	Preço Unitário*	Por amostra*	Equipamentos necessários	
<b>Qiamp stool mini kit</b>	271,54	5,4308	<b>Heatblock</b>	<b>213,037</b>
<b>RNA carrier</b>	148,40	0,024	<b>Vortex</b>	110
<b>Tubos 2ml</b>	3,80 (500U)	0,0152	<b>Centrífuga</b>	610,05
<b>Tubos 1,5ml</b>	7,44 (500U)	0,0446	<b>Congelador</b>	612
<b>Pontas azúis</b>	7,08 (1000U)	0,0425	<b>Micropipetas (2-20µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)</b>	375
<b>Pontas amarelas</b>	2,86 (1000U)	0,0200	<b>Total</b>	<b>1920,087</b>
<b>TOTAL</b>		<b>5,5771</b>		

\*valor sem IVA

Tabela 12 – Custos e materiais utilizados na extracção pelo PF, por amostra

Reagente/Material	Preço Unitário*	Por amostra*	Equipamentos necessários	
<b>Cards</b>	25,4 (10 cards x 4)	0,635	<b>Heatblock</b>	<b>213,037</b>
<b>Solution 1 (Purification)</b>	1381,70 (1000ml)	1,865	<b>Puncher</b>	134,40
<b>Solution 2 (Elution)</b>	699,17 (500ml)	0,769	<b>Micropipetas (2-20µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)</b>	250
<b>Tubos 1,5ml</b>	7,44 (500U)	0,0446	<b>Total</b>	<b>597,437</b>
<b>Pontas azúis</b>	7,08 (1000U)	0,0566		
<b>Pontas amarelas</b>	2,86 (1000U)	0,0057		
<b>TOTAL</b>		<b>3,3759</b>		

\*valor sem IVA

Tabela 13 – Comparação do custo, materiais e duração das extracção kitQ e GQ.

	KitQ	GQ
<b>Custo por amostra*</b>	5,6€	3,4€
<b>Tempo de extracção</b>	3 horas	1,5 horas
<b>Custo equipamentos*</b>	1920,1€	597,4€

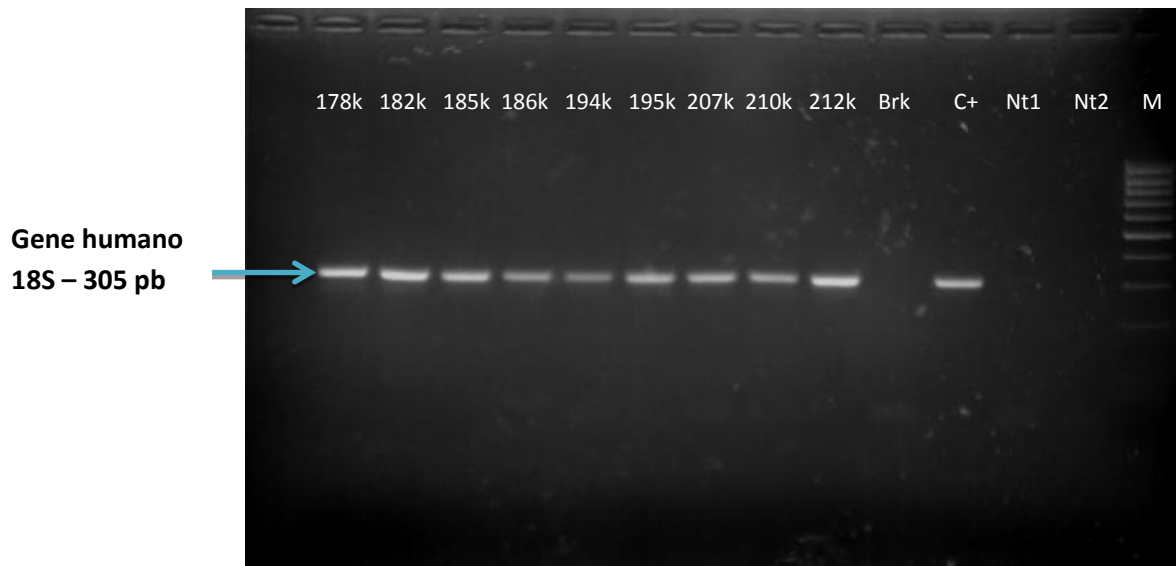
\*valor sem IVA

#### IV.4 - Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico molecular foram incluídas adicionalmente 23 amostras às utilizadas na comparação de métodos de extracção de DNA (n=57), num total de 80 amostras indicadas na tabela 7.

#### IV.4.1 - Amplificação do gene humano 18S

Foi amplificado com sucesso em todas as amostras utilizadas neste estudo (n=80) o fragmento de 305 pb do gene humano RNA ribossomal 18S (controlo interno), confirmando assim o sucesso da extracção de DNA. (Fig. 5)



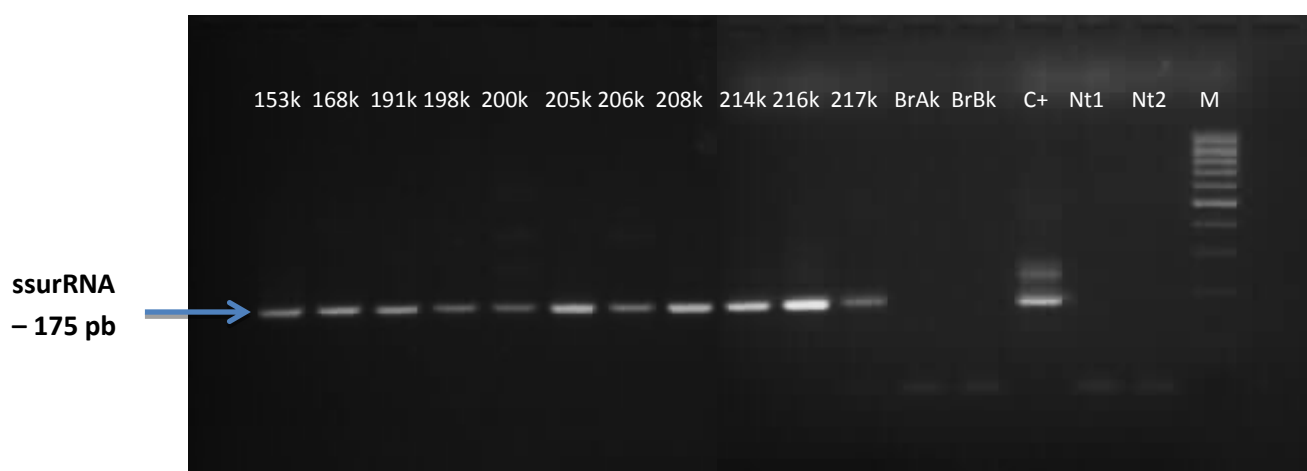
**Fig. 5** - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento de 305 pb do gene humano 18S em amostras de DNA humano em gel de agarose a 2%. Brk: branco de extracção de DNA (kit); (C+): controlo positivo; Nt1: controlo negativo da 1ª reacção de PCR; Nt2: controlo negativo da 2ª reacção; M: marcador de peso molecular (100 pb).

#### IV.4.2 - Amplificação do gene *ssurRNA* (*Giardia*)

Para todas as amostras suspeitas clinicamente para Giardíase, assim como as microscopicamente positivas, num total de 38 isolados, extraídas utilizando ambos os métodos, procedeu-se à amplificação por PCR do fragmento de 175 pb do gene *ssurRNA* de *G. lamblia*. (Fig. 6). Testou-se adicionalmente uma amostra (107), na qual não foi possível realizar o exame microscópico, devido ao longo período de tempo entre a colheita e a sua entrada no Laboratório de Patologia Tropical. Contudo, havia a informação de que esta amostra provinha de um indivíduo com giardíase crónica, pelo

que se procedeu à respectiva análise molecular, obtendo-se um sinal de amplificação para *G.lamblia*.

Das 19 amostras microscopicamente positivas para *Giardia* testadas em 94,7% (18/19) (Tabela 14 e 17) dos isolados verificou-se a amplificação do gene ssurRNA. Em apenas em um isolado positivo pela microscopia (65), não ocorreu amplificação de DNA (Tabela 17). Para os isolados microscopicamente negativos para *Giardia* não houve amplificação para nenhuma das amostras testadas (n=19) (Tabela 14 e 17)



**Fig.6** - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento do gene ssurRNA – 175 pb em amostras de DNA humano em gel de agarose a 2%. BrAk e BrBk: brancos de extracção de DNA (kit); (C+): controlo positivo; Nt1: controlo negativo da 1ª reacção de PCR; Nt2: controlo negativo da 2ª reacção; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabela 14. – Total de amostras microscopicamente positivas e testadas por PCR para a amplificação do gene ssurRNA de *Giardia*

	PCR + <i>Giardia</i>	PCR - <i>Giardia</i>
<b>Mic + (19)</b>	94,7% (18/19)	5,3% (1/19)
<b>Mic – (19)</b>	0,0% (0/19)	100,0% (19/19)

#### IV.4.3 - Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *E. histolytica*, *E. moshkovskii* e *E. dispar*

Todas as amostras suspeitas clinicamente para amebíase, assim como as microscopicamente positivas, num total de 42 cuja extracção de DNA foi efectuada utilizando kitQ ou GQ, procedeu-se à amplificação por PCR do fragmento 16S de *E. histolytica*, *E. moshkovskii* e *E. dispar* (Fig. 7).

Foi amplificado DNA de *E. dispar* em 50,0 % (11/22) das amostras, provenientes dos isolados microscopicamente positivos (n=22) (Tabela 15) e DNA de *E. histolytica* em 20,0% (4/20) (Tabela 15) das amostras dos isolados microscopicamente negativos para Amebíase (n=20). Não foi amplificado DNA de *E.moshkovskii* em qualquer amostra (tabela 16).

Tabela 15. – Total de amostras microscopicamente positivas e testadas por PCR para a amplificação do fragmento 16S de *Entamoeba* spp

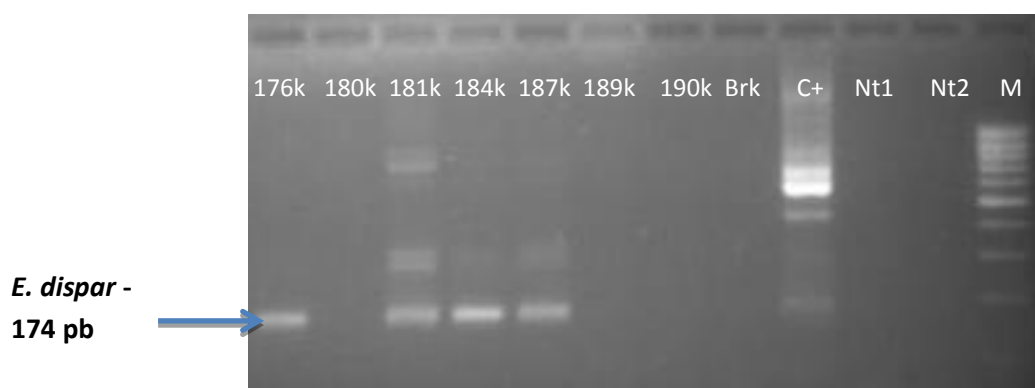
	PCR + <i>Entamoeba</i> spp	PCR - <i>Entamoeba</i> spp
<b>Mic + (22)</b>	50,0% (11/22)	50,0% (11/22)
<b>Mic – (20)</b>	20,0% (4/20)	80,0% (16/20)

Tabela 16 – Amostras testadas por PCR para a amplificação do fragmento 16S de *Entamoeba* spp

Amostras	Mic +	PCR <i>Entamoeba</i> spp			Amostras	Mic -	PCR <i>Entamoeba</i> spp		
		<i>E.h.</i>	<i>E.d.</i>	<i>E.m.</i>			<i>E.h.</i>	<i>E.d.</i>	<i>E.m.</i>
<b>16</b>	<b>+</b>	-	+	-	<b>37</b>	-	-	-	-
<b>70</b>	<b>+</b>	-	+	-	<b>66</b>	-	-	-	-
<b>103</b>	<b>+</b>	-	-	-	<b>91</b>	-	-	-	-
<b>112</b>	<b>+</b>	-	+	-	<b>98</b>	-	-	-	-
<b>117</b>	<b>+</b>	-	-	-	<b>102</b>	-	-	-	-
<b>120</b>	<b>+</b>	-	+	-	<b>125</b>	-	-	-	-

Amostras	Mic +	PCR <i>Entamoeba</i> spp			Amostras	Mic -	PCR <i>Entamoeba</i> spp		
		<i>E.h.</i>	<i>E.d.</i>	<i>E.m.</i>			<i>E.h.</i>	<i>E.d.</i>	<i>E.m.</i>
122	+	-	+	-	133	-	+	-	-
134	+	-	+	-	135	-	-	-	-
159	+	-	-	-	150	-	+	-	-
162	+	-	-	-	154	-	+	-	-
173	+	-	-	-	155	-	-	-	-
175	+	-	-	-	161	-	-	-	-
176	+	-	+	-	166	-	-	-	-
180	+	-	-	-	169	-	+	-	-
181	+	-	+	-	170	-	-	-	-
184	+	-	+	-	179	-	-	-	-
187	+	-	+	-	188	-	-	-	-
189	+	-	-	-	192	-	-	-	-
190	+	-	-	-	193	-	-	-	-
196	+	-	+	-	209	-	-	-	-
213	+	-	-	-					
215	+	-	-	-					
Total	22	0	11	0		20	4	0	0





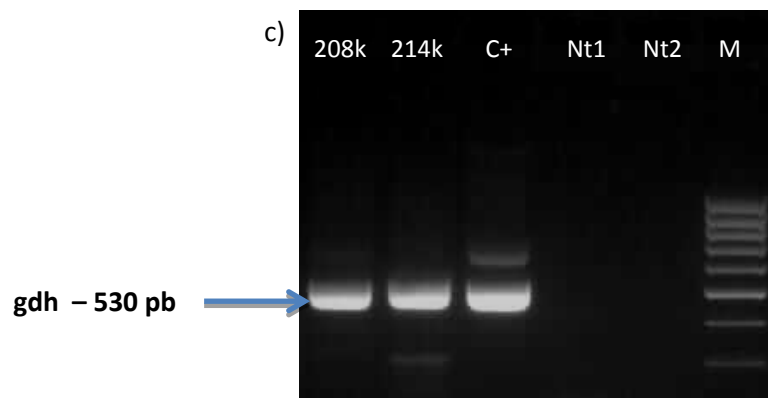
**Fig. 7** - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação do fragmento do gene 16S de *E. histolytica* (439 pb), *E. moshkovskii* (553 pb) e *E. dispar* (174 pb) em amostras de DNA humano em gel de agarose a 2%. Brk: branco de extração de DNA (kit); (C+): controlo positivo; Nt1: controlo negativo da 1ª reacção de PCR; Nt2: controlo negativo da 2ª reacção; M: marcador de peso molecular (100 pb).

## IV.5 - Genotipagem de *G. lamblia*

### IV.5.1 - Amplificação do gene $\beta$ -giardina, *tpi* e *gdh*

Foram testadas para a amplificação dos fragmentos dos genes *bg* (511 pb), *tpi* (530 pb) e *gdh* (530 pb) todas as amostras microscopicamente positivas para *Giardia* (n=19) (Fig. 8). Destas houve amplificação em: 52,6% (10/19) das amostras para o gene *bg*; 73,7% (14/19) para o gene *tpi*; 78,9% (15/19) para o gene *gdh* (Tabela 17).





**Fig.8 (a, b, c)** - Produtos amplificados por PCR representativos dos resultados obtidos para a amplificação dos fragmentos dos genes *bg* (511 pb), *tpi* (530 pb) e *gdh* (530 pb) em amostras de DNA humano em gel de agarose a 2%. BrAk, BrBk e BrCk: brancos de extracção de DNA (kit); (C+): controlo positivo; Nt1: controlo negativo da 1ª reacção de PCR; Nt2: controlo negativo da 2ª reacção; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabela 17 – Amostras testadas por PCR para a amplificação dos genes *ssurRNA*, *bg*, *tpi*, *gdh* de *G. lamblia*.

Amostras	Mic	PCR <i>Giardia</i>				Amostras	Mic	PCR <i>Giardia</i>			
		<i>ssurRNA</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>			<i>ssurRNA</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>
34	+	+	-	-	+	191	+	+	-	+	+
60	+	+	-	-	+	198	+	+	-	-	+
65	+	-	-	+	+	200	+	+	-	+	-
94	+	+	+	+	+	205	+	+	+	+	+
107	*	+	+	+	+	206	+	+	+	+	-
116	+	+	-	+	+	208	+	+	+	+	+
126	+	+	-	-	-	214	+	+	+	+	+
139	+	+	+	+	+	216	+	+	+	-	+
153	+	+	+	+	+	217	+	+	-	+	-
168	+	+	+	+	+						

Nas 10 amostras em que se conseguiu amplificar o gene da *bg* foi possível a sequenciação com sucesso em todas essas 10 amostras. Para o gene do *tpi* só foi possível a sequenciação em 12 das 14 amostras amplificadas, e para o *gdh* apenas 8 em 15. (Tabela 18)

Tabela 18. – Amostras amplificadas por PCR e sequenciadas para os genes *bg*, *tpi* e *gdh* de *Giardia* sp.

Amostras	PCR			Sequenciação			Amostras	PCR			Sequenciação		
	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>		<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>
34	-	-	+	-	-	-	191	-	+	+	-	+	-
60	-	-	+	-	-	-	198	-	-	+	-	-	-
65	-	+	+	-	-	-	200	-	+	-	-	-	-
94	+	+	+	+	+	+	205	+	+	+	+	+	+
107	+	+	+	+	+	-	206	+	+	-	+	+	
116	-	+	+	+	+	-	208	+	+	+	+	+	+
126	-	-	-	-	-	-	214	+	+	+	+	+	+
139	+	+	+	+	+	+	216	+	-	+	+	-	+
153	+	+	+	+	-	+	217	-	+	-	-	+	-
168	+	+	+	+	+	+							

A comparação utilizando o programa BLAST das sequências obtidas, com as depositadas no GenBank<sup>TM</sup> demonstrou 4 isolados pertencentes ao genótipo A (94, 107, 139 e 214) e 6 ao genótipo B (153, 168, 205, 206, 208 e 216) para o gene *bg*. Relativamente ao genótipo A os isolados 94 e 107 apresentam 100% de identidade com a sequência EU188634, o isolado 139 possuía 100% de identidade com a sequência AY072724 e o isolado 214, 100% de identidade com a sequência AY072723. Para o genótipo B os isolados 205 e 206 apresentavam 99% de identidade com a sequência AY072728, os isolados 168 e 208 possuíam 99% de identidade com a sequência DQ090530 e os isolados 153 e 216 demonstraram 99% de homologia com a sequência AY072727. Todas estas sequências pertencem a *G. lamblia*.

Para o gene do *tpi* 5 amostras pertenciam ao genótipo A (94, 107 139, 191, e 214) e 7 ao genótipo B (116, 153, 168, 205, 206, 208 e 217). Relativamente ao genótipo A, o isolado 214 apresenta 100% de identidade com a sequência EU518561 enquanto as restantes apresentavam 100% de identidade com a sequência AY368157 depositada no GenBank<sup>TM</sup>. No Genótipo B, os isolados 116 e 205 apresentavam 100% de identidade com a sequência AY368164 e o isolado 153 99% de homologia com esta mesma sequência. O isolado 168 possuía 98% de identidade com a sequência AY368169, o isolado 217 apresentava 100% de homologia com a sequência AY228630 e os isolados 206 e 208 apresentavam 100% de identidade com a sequência AY368167.

No gene do *gdh* apenas 3 isolados foram identificados como sendo do genótipo A (39, 139 e 214) e 5 do genótipo B (153, 168, 205, 208 e 216). Relativamente ao genótipo A os isolados 139 e 217 apresentaram 99% de identidade com a sequência EF685689 e o isolado 94 apresentou 99% de identidade com a sequência EF507680.

Para o genótipo B, os isolados 153 e 205 apresentavam 98% de identidade com a sequência EF507654, o isolado 208 possuía 99% de identidade com a sequência EF507682 e os isolados 216 e 168 apresentaram 99% e 97%, respectivamente, de identidade com a sequência EU834844 (Tabela 19).

No geral, 61,5% (8/13) dos isolados sequenciados foram identificados como genótipo B e 38,5% (5/13) como pertencentes ao genótipo A.

Tabela 19.- Genótipo das amostras sequenciadas para os genes da *bg*, *tpi* e *gdh* de *Giardia* obtidas para comparação com as sequências depositadas no GenBank<sup>TM</sup> acima referidas

<b>Isolado</b>	<b><i>bg</i></b>	<b><i>tpi</i></b>	<b><i>gdh</i></b>
<b>94</b>	A	A	A
<b>107</b>	A	A	
<b>116</b>		B	
<b>139</b>	A	A	A
<b>153</b>	B	B	B
<b>168</b>	B	B	B
<b>191</b>		A	
<b>205</b>	B	B	B
<b>206</b>	B	B	
<b>208</b>	B	B	B
<b>214</b>	A	A	A
<b>216</b>	B		B
<b>217</b>		B	

Para a definição dos subgenótipos procedeu-se à análise dos polimorfismos de posição (*single nucleotid polymorphism* – SNP) de acordo com Cacciò et al. (2008)

Devido ao elevado grau de polimorfismos observados a nível dos genótipos A e especialmente B, houve dificuldade na determinação dos respectivos subgenótipos (Tabela 26).

Dos quatro isolados do genótipo A para o gene da *bg*, três (94, 107, 214) são pertencentes ao subgenótipo A2, e um (139) ao subgenótipo A3. Para os restantes seis

isolados não foi possível a determinação a nível do subgenótipo pois as alterações nucleotídicas observadas nas sequências obtidas não correspondem na sua totalidade às das sequências de referência dadas por Cacciò et al (2008) (Tabela 20 e 21).

Para as amostras sequenciadas para o gene *tpi*, os cinco isolados (94, 107, 139, 191 e 214) obtidos para o genótipo A, diferem apenas em uma posição (108) da sequência de referência para o genótipo A2. Para as restantes sete amostras (116, 153, 168, 205, 206, 208 e 217) amplificadas para este gene pertencentes ao genótipo B não foi possível a determinação do subgenótipo pois as alterações nucleotídicas não correspondiam às publicadas por Cacciò et al (2008) (Tabela 22 e 23).

No gene do *gdh*, tal como ocorreu com o *tpi* não foi possível determinar os subgenótipos para qualquer isolado, tanto das três amostras pertencentes ao genótipo A (94, 139 e 214) como das cinco (153, 168, 205, 208 e 216) pertencentes ao genótipo B (Tabela 24 e 25).

Tabela 20 - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene *bg* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição															Genótipo/ Subgenótipo
		162	255	354	378	411	421	429	444	462	502	534	564	567	582	690	
<b>A1</b>		c	c	t	t	c	c	t	t	a	g	g	t	c	a	a	-
<b>A2</b>		c	c	t	t	c	c	t	t	a	g	g	t	t	a	g	-
94	Portugal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N/A	<b>A2</b>
107	Portugal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N/A	<b>A2</b>
214	Paquistão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N/A	<b>A2</b>
<b>A3</b>		c	c	t	t	c	t	c	t	a	g	g	t	t	a	g	-
139	Portugal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N/A	<b>A3</b>
<b>A4</b>		c	c	t	t	c	c	t	t	a	a	g	t	c	a	a	-
<b>A5</b>		t	c	t	t	t	c	t	t	a	g	g	t	c	a	a	-
<b>A6</b>		<b>c</b>	<b>t</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>g</b>	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>g</b>	<b>a</b>	-

N/A – não aplicável

Tabela 21 - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene *bg* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição									Genótipo/ Subgenótipo
		171	234	288	315	318	330	399	525	579	
B3		c	g	c	c	c	c	c	t	t	-
153	d*	.	R	.	Y	t	.	.	.	a	B
168	Portugal	.	a	.	.	t	.	.	.	a	B
205	d*	.	a	.	t	t	.	.	c	a	B
206	d*	.	a	.	t	t	.	.	c	a	B
208	d*	.	a	.	Y	t	.	.	.	a	B
216	d*	.	a	.	.	t	.	.	.	a	B
B4		t	a	t	t	t	c	t	t	t	

R=A/G; Y=C/T



Tabela 22 - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene *tpi* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição																				Genótipo/ Subgenótipo
		54	68	93	108	115	117	120	129	133	144	162	174	189	231	237	352	394	399	492	498	
<b>A1</b>		t	g	t	c	g	c	c	t	g	g	a	a	a	c	a	c	t	c	g	c	-
<b>A2</b>		t	g	t	t	g	c	c	c	g	g	a	a	a	c	a	c	t	t	g	c	-
94	d*	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>
107	Portugal	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>
139	Portugal	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>
191	d*	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>
214	Paquistão	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>
<b>A3</b>		c	a	t	t	a	c	c	c	g	g	a	a	a	c	g	c	t	c	g	c	-
<b>A4</b>		c	a	t	t	g	c	c	c	g	g	a	a	a	c	g	c	t	c	g	c	-
<b>A5</b>		c	a	t	t	g	c	c	c	g	g	a	a	a	c	g	c	t	t	g	c	-
<b>A6</b>		t	g	c	c	g	t	t	t	t	a	g	g	g	t	a	t	c	c	t	t	-

Tabela 23 - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene *tpi* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição															Genótipo/ Subgenótipo
		39	45	67	91	162	165	168	204	210	265	402	429	456	471	483	
<b>B3</b>		a	t	a	c	g	c	c	t	g	c	a	g	g	a	a	-
116	d*	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
153	Iraque	g	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
168	d*	R	.	.	Y	.	Y	Y	.	R	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
205	d*	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
206	d*	.	.	.	t	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
208	d*	.	.	.	Y	R	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
217	R.D.C.	g	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>B</b>
<b>B4</b>		-	-	-	t	g	t	t	t	a	c	a	a	g	a	a	-

R=A/G; Y=C/T

Tabela 24 - Alterações nucleotídicas no genótipo A no gene *gdh* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição																														Genótipo/ Subgenótipo				
		5 2 2	5 2 5	5 3 1	5 3 4	5 7 0	6 0 3	6 2 1	6 3 3	6 3 6	6 7 2	6 7 5	6 8 5	6 8 7	6 9 3	6 9 9	7 2 0	7 2 3	7 5 1	7 7 8	7 8 6	8 0 7	8 3 1	8 6 1	8 6 7	8 8 5	8 8 0	8 9 4	9 0 2	9 0 9	9 1 2	9 1 5	9 2 4	9 4 6		
A1		g	c	c	a	c	t	c	c	t	c	t	g	t	c	t	t	c	c	c	c	c	c	c	t	t	c	t	c	c	c	g	c	t	a	-
A2		g	c	c	a	c	t	c	c	t	c	t	g	t	c	c	t	c	t	c	c	t	t	c	c	c	c	t	t	c	g	c	t	g	-	
94	d*	.	.	.	.	.	c	t	.	.	.	.	a	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
139	Portugal	.	.	.	.	.	c	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
214	Paquistão	.	.	.	.	.	c	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
A3		g	c	c	a	c	t	c	c	t	c	t	a	t	c	t	t	c	t	c	c	t	t	c	c	c	c	t	t	c	g	c	t	g	-	
A4		g	c	c	a	c	t	c	c	t	c	t	g	t	c	t	t	c	t	c	c	t	t	c	c	c	c	t	t	c	g	c	t	g	-	
A5		g	c	c	a	c	t	c	c	t	c	t	g	t	c	t	t	c	c	c	c	c	c	t	t	c	t	c	c	c	g	c	t	g	-	
A6		c	t	t	g	t	c	c	t	c	t	c	g	c	t	c	c	t	c	a	t	c	c	t	c	t	c	t	t	t	a	t	c	g	-	

Tabela 25 - Alterações nucleotídicas no genótipo B no gene *gdh* em isolados humanos de acordo com Cacciò et al. (2008)

Isolado/ Subgenótipo	Origem Geográfica	Posição																						Genótipo/ Subgenótipo
		519	540	546	561	570	597	612	690	699	705	723	724	756	784	807	825	834	840	867	876	918	921	
B3		c	t	c	c	c	c	g	g	t	t	c	c	t	a	t	a	c	g	c	g	g	g	-
153	d*	Y	.	.	.	Y	.	R	.	c	.	.	.	.	.	.	R	Y	.	.	.	.	.	B
168	Portugal	.	Y	Y	.	.	Y	R	.	c	.	T	.	.	.	K	.	Y	.	Y	.	.	R	B
205	Portugal	t	c	Y	.	.	.	R	.	c	.	T	.	.	.	.	R	Y	.	.	.	.	.	B
216	d*	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	Y	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	a	B
B4		c	t	c	t	c	c	a	g	c	t	t	c	t	c	t	g	c	a	c	g	g	g	-
208		.	.	.	c	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	a	.	R	.	g	.	.	.	.	B

R=A/G; Y=C/T; K= G/T

Tabela 26 – Comparação dos três loci para a identificação dos isolados de *Giardia* a nível de genótipo e subgenótipo.

Isolado	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>
94	A2	A	A
107	A2	A	
116		B	
139	A3	A	A
153	B	B	B
168	B	B	B
191		A	
205	B	B	B
206	B	B	
208	B	B	B
214	A2	A	A
216	B		B
217		B	

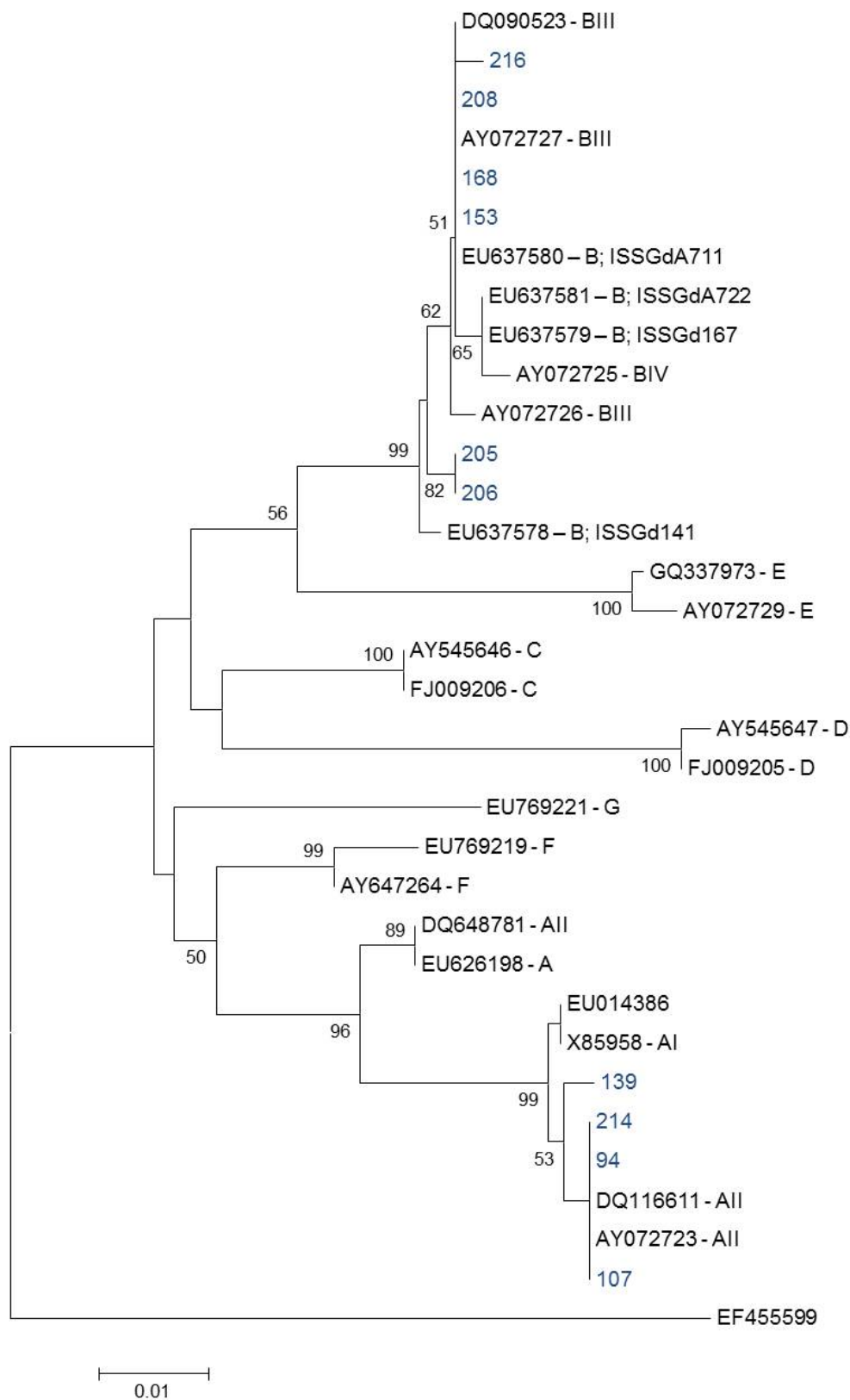
#### IV.6 - Análise filogenética das sequências de DNA de *bg*, *tpi* e *gdh*

As diferentes sequências obtidas neste estudo, foram comparadas com sequências previamente conhecidas do GenBank<sup>TM</sup>, alinhadas recorrendo ao programa ClustalW e posteriormente sujeitas a uma análise filogenética utilizando o software Mega 4 (Tamura et al 2007).

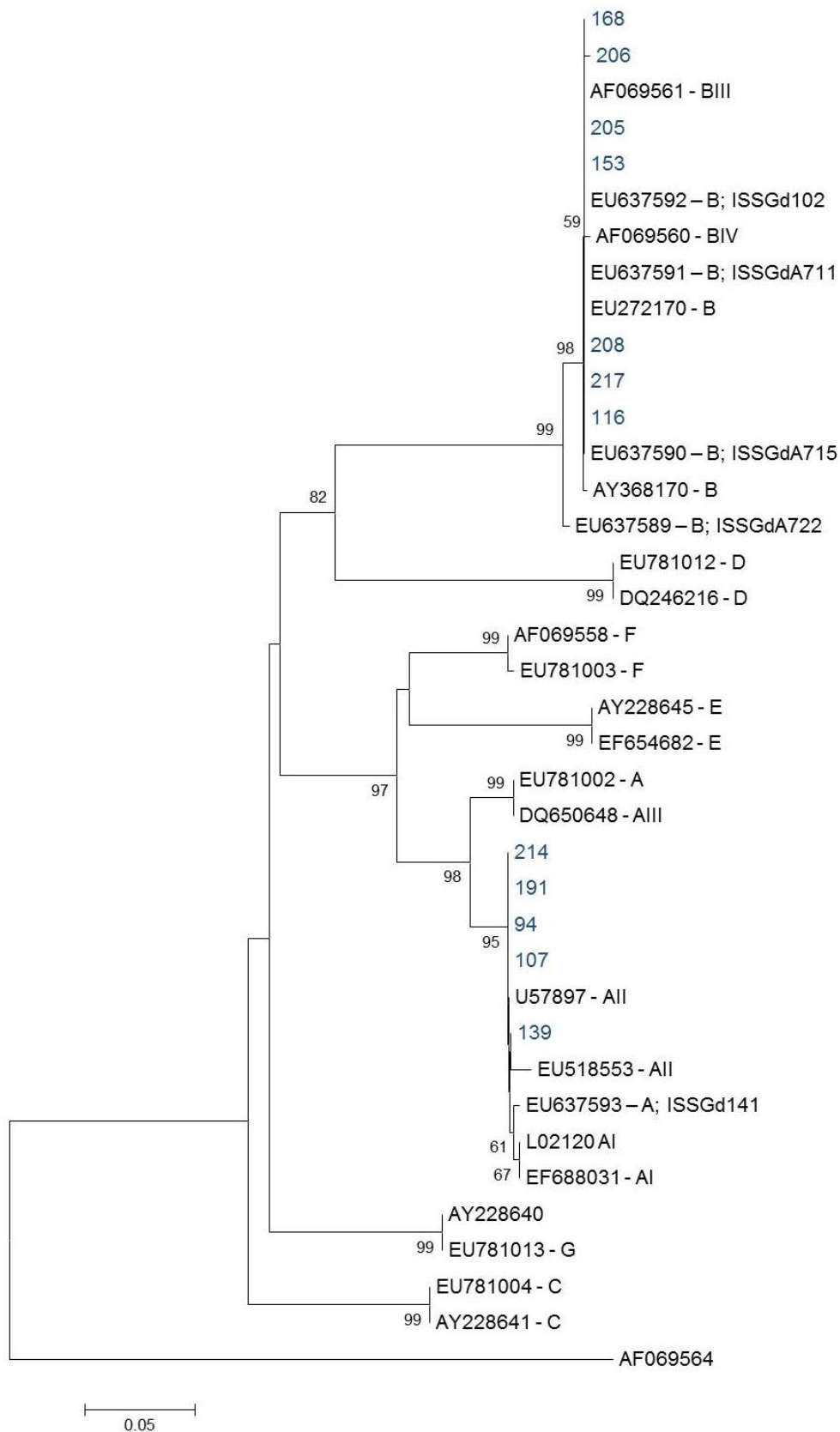
A análise filogenética isolada de cada um dos três *loci* analisados (*bg*, *tpi* e *gdh*) veio comprovar os resultados previamente obtidos por análise de polimorfismos de posição, confirmando os genótipos para as amostras testadas (Fig. 9, 10 e 11).

Adicionalmente realizou-se também a análise filogenética concatenada com o objectivo de fornecer uma informação mais robusta das sequências, tendo sido utilizadas apenas as sete amostras (94, 139, 153, 168, 205, 208 e 214) para as quais se conseguiu sequenciar os três genes alvo (Fig. 12).

As Fig.s 9, 10 e 11 representam as árvores filogenéticas obtidas através da análise *neighbour-joining* das sequências de *bg*, *tpi* e *gdh*, respectivamente. As árvores demonstram a existência de sete agrupamentos distintos, correspondendo aos sete genótipos A, B, C, D, E, F, e G.

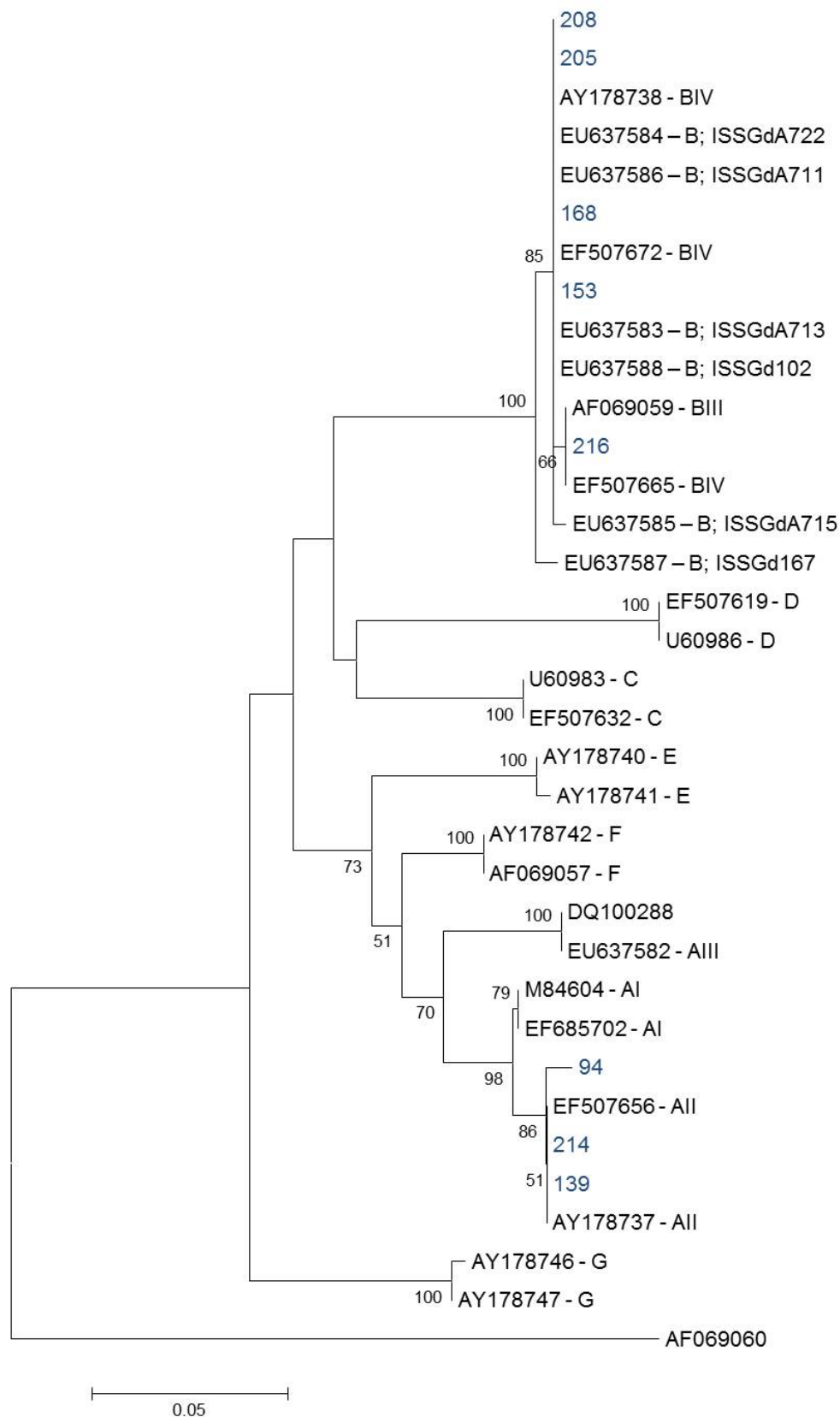


**Fig.9.** Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene *bg* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.

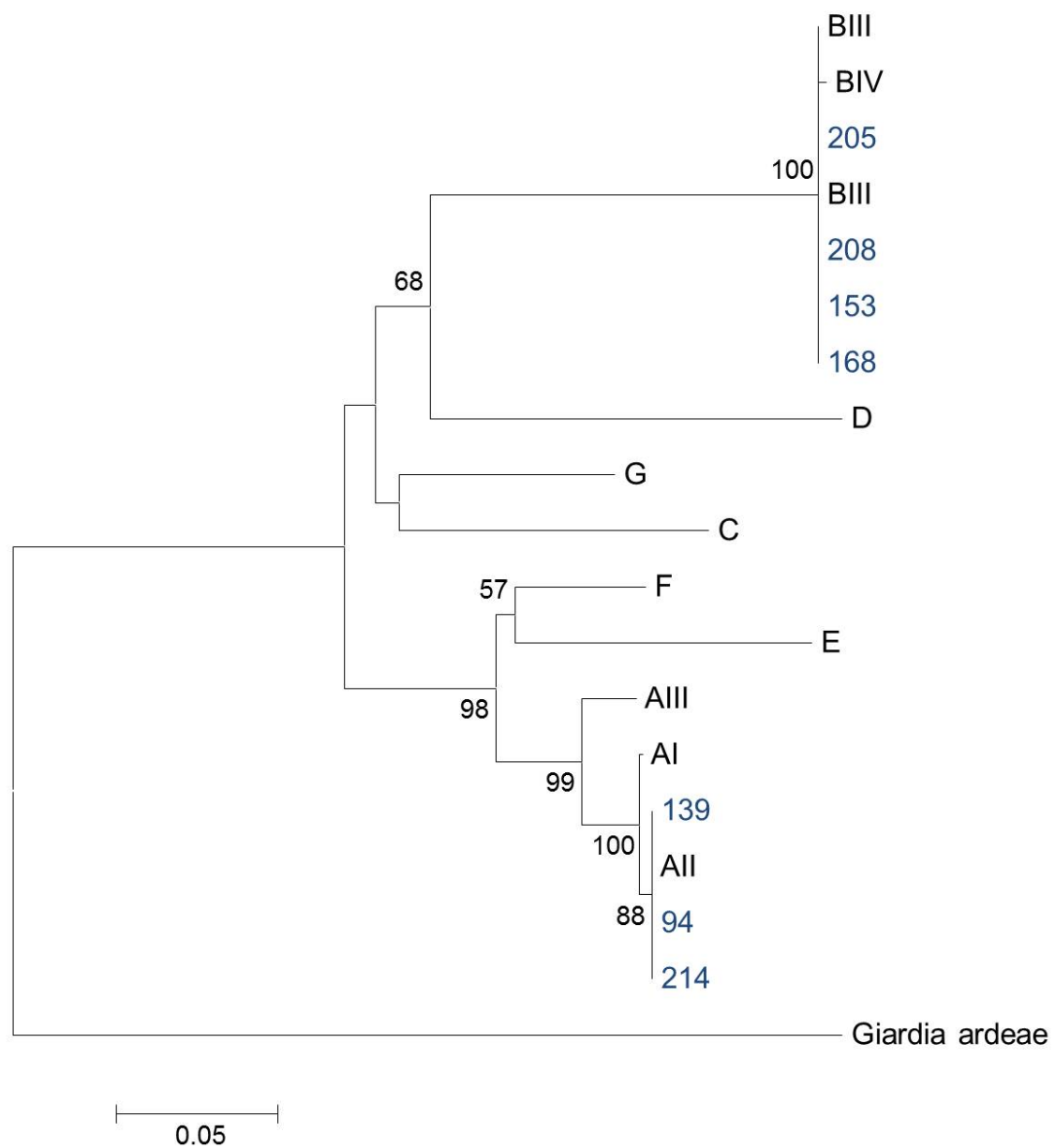


**Fig.10.** Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene *tpi* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.





**Fig.11.** Árvore representativa das relações filogenéticas das sequências do gene *gdh* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.



**Fig. 12.** Árvore concatenada representativa das relações filogenéticas das sequências do gene *bg*, *tpi* e *gdh* de *Giardia* utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. As proporções de *bootstrap* foram calculadas pela análise de 1000 replicados.

## V. - Discussão

Vários estudos demonstraram que uma grande proporção dos viajantes e imigrantes provenientes de países tropicais e subtropicais são portadores de agentes patogénicos intestinais (Ekdahl & Andersson, 2005).

A infecção por *G. lamblia* é considerada como uma das principais causas de diarreia não viral nos países desenvolvidos e ocorre ainda com maior frequência em indivíduos com queixas gastrointestinais que retornam de viagens internacionais a países tropicais e subtropicais. Embora sendo *E. histolytica* menos frequente o seu diagnóstico precoce é de extrema importância considerando o seu carácter invasivo (Hove et al 2009).

Apesar da microscopia constituir a técnica padrão para o diagnóstico laboratorial das protozooses intestinais, é uma técnica laboriosa e o seu desempenho depende da experiência do microscopista. Para aumentar a sua sensibilidade recorre-se à análise de vários isolados, aplicam-se técnicas de concentração, bem como técnicas de coloração para facilitar a identificação de quistos e trofozoítos. Portanto métodos adicionais como detecção de antígeno ou métodos moleculares como a PCR precisam de ser utilizados (Hove et al 2009).

No presente trabalho estudou-se a aplicação de métodos moleculares, nomeadamente a PCR relativamente à detecção e identificação dos protozoários intestinais *Giardia lamblia* e *Entamoeba* spp e a consequente genotipagem de *Giardia* nas amostras recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, no período entre Setembro de 2007 e Agosto de 2009.

Nas amostras analisadas (n=80) relativamente aos isolados que possuíam suspeita clínica e o respectivo diagnóstico laboratorial obtido (microscopia positiva) verificou-se que 22,2% (6/26) das amostras suspeitas de *Giardia* foram positivas por microscopia e 25,0% (7/28) dos com suspeita clínica para *Entamoeba* spp. Este facto poderá dever-se à dificuldade na distinção entre a sintomatologia de Giardíase e Amebíase, de outras patologias intestinais, tais como infecções por certos vírus entéricos, disenteria bacilar, bactérias intestinais, intoxicações alimentares, colite ulcerosa ou diarreia provocada pela *Escherichia coli* enterotoxigénica, ou também devido à limitada sensibilidade da microscopia (cerca de 60% para *Entamoeba* spp. e 70% para *Giardia*) (Scheffler & Etffa, 1994; Garcia, 2001; Khairnar & Parija, 2007).

Das 80 amostras que foram incluídas no presente estudo, recebidas no Laboratório de Patologia Tropical do IHMT, Lisboa, 23,8 % (19/80) foram microscopicamente positivas para *Giardia* e 27,5% (22/80) positivas para *Entamoeba* spp. As restantes amostras utilizadas neste estudo apesar de microscopicamente negativas, foram incluídas pois apresentavam suspeita clínica para *G.lamblia* – 23,8% (19/80) ou *E. histolytica* – 25,0% (20/80).

No que se refere às amostras microscopicamente positivas para *Entamoeba* spp. (n=22) desconhece-se a origem geográfica da maioria dos indivíduos (n=13). Os restantes (n=9) são maioritariamente originários de países Tropicais (n=7), existindo apenas dois indivíduos de nacionalidade Portuguesa, sendo que um destes apresenta estadia prévia em país tropical (162). Dos indivíduos de nacionalidade desconhecida três tiveram passagem prévia por um país tropical e dois dos indivíduos de origem

geográfica tropical tiveram estadia em outro país tropical que não o da sua origem (Tabela 7).

Apesar de se conhecer a origem geográfica ou a estadia em país tropical dum número reduzido de indivíduos (n=12) os resultados obtidos neste estudo sugerem que a maioria das amostras microscopicamente positivas para *Entamoeba* spp. provêm destes mesmos indivíduos (n=11), sugerindo tal como nos estudos publicados por Hove et al (2009) e Fotedar et al (2007) que os viajantes e imigrantes de países tropicais e subtropicais são um grupo de elevado risco para infecção *Entamoeba* spp. (Fotedar et al 2007; Hove et al, 2009).

Relativamente às amostras microscopicamente positivas para *Giardia* (n=19) a naturalidade da maioria dos indivíduos (n=10) é desconhecida, apresentando apenas um, passagem por país tropical. Nos restantes (n=9), quatro possuem naturalidade Portuguesa sem terem estado em qualquer país tropical e cinco são originários de países tropicais, sendo que dois destes apresentam estadia prévia em outro país tropical que não o da sua origem.

Tal como no caso anterior, apesar de haver um número reduzido de indivíduos dos quais se conhece a sua naturalidade, ou a sua passagem por país tropical (n=10) os resultados obtidos neste estudo sugerem que a maioria das amostras microscopicamente positivas para *Giardia* também provêm destes indivíduos (n=6) oriundos ou com estadia prévia em Países tropicais, assim como se verificou para *Entamoeba* spp.. Estas observações já foram anteriormente descritas nos estudos publicados de Hove et al (2009) e Ekdahl & Andersson (2005) em que os viajantes e

imigrantes de países tropicais e subtropicais apresentam maior incidência de infecção por *Giardia* (Ekdahl & Andersson, 2005; Hove et al 2009).

Neste estudo procurou avaliar-se a eficiência e o custo-benefício do uso do papel de filtro e respectivo método de extracção GQ como método viável para a conservação de material biológico fecal, em especial por dispensar o armazenamento a frio. Com esse intuito efectuou-se a comparação deste procedimento com um método usual de armazenamento, congelamento a -20°C e consequente método de extracção, kitQ. Foram utilizadas para esse efeito 57 amostras das 80 analisadas neste estudo. A inclusão de apenas 57 amostras nesta comparação deveu-se ao esgotamento do material biológico que não possibilitou efectuar o procedimento experimental de ambos os métodos de extracção a todas as 80 amostras e por não ter sido possível a reacção de amplificação por PCR em cinco amostras por serem amostras muito antigas (mais de dois anos e meio de conservação a -20°C).

Na comparação entre os dois métodos de conservação papel de filtro, -20°C e respectivas extracções observou-se que ambos os métodos, GQ e kitQ, apresentam eficácia idêntica, verificando-se que apenas numa amostra de *Giardia* amplificada pelo kitQ não obteve detecção pelo GQ.

Das 57 amostras 24,6% (14/57) eram microscopicamente positivas para *Giardia*, 31,6% (18/57) microscopicamente negativas, 24,6% (14/57) positivas por exame microscópico para *Entamoeba* spp e 19,3% (11/57) negativas. As amostras de *Giardia* foram amplificadas pela PCR tendo como alvo o fragmento do gene *ssurRNA* e os isolados de *Entamoeba* spp o fragmento do gene 16S rRNA.

A escolha do gene alvo *ssurRNA* para amplificação de DNA de *Giardia* baseia-se na sua elevada sensibilidade e especificidade de amplificação devido à sua natureza multicópia e conservativa (Cacciò & Ryan, 2008).

Para *Entamoeba* spp. não se verificou qualquer discrepância na amplificação do gene 16S *rRNA* tendo se detectado DNA amplificado em 57,1% (8/14) dos isolados microscopicamente positivos, tanto para as amostras conservadas em papel de filtro utilizando o método de extracção GQ, quer para as amostras conservadas a -20°C e consequente método de extracção kitQ. Em oposição, não ocorreu amplificação do gene 16S *rRNA* por PCR em 42,9% (6/14) das amostras microscopicamente positivas testadas para ambos os métodos de extracção.

Para as amostras microscopicamente negativas para *Entamoeba* spp, os resultados também foram concordantes para ambos os métodos de extracção, kitQ e GQ, não ocorrendo amplificação em qualquer amostra (0/11).

Nas amostras microscopicamente positivas para *Giardia* houve detecção do gene *ssurRNA* em 100,0% (14/14) das amostras extraídas com o kitQ, e em 92,9% (13/14) das amostras extraídas com o GQ. Poderá não se ter registado amplificação após extracção por GQ nesta única amostra devido a factores intrínsecos ao ensaio de PCR usado neste trabalho e/ou à presença de inibidores que afectam a actividade da *Taq* polimerase, e que não foram eficientemente removidos após a extracção do DNA (Gelanew, 2007).

Para as amostras microscopicamente negativas para *Giardia* (n=18) o resultado de amplificação por PCR para os dois métodos de extracção foi igual, não tendo sido detectado DNA de *Giardia* em qualquer amostra testada (0/18).

Relativamente ao custo, o método de extracção por GQ é bastante mais vantajoso, revelando um custo por amostra de apenas 3,4€ enquanto que a quantia por amostra para a extracção através do kitQ ascende a uma diferença de 2,2€, custando 5,6 € por isolado. Em relação ao material necessário para a extracção também o GQ se revela muito mais vantajoso e custo-eficiente, sendo o custo total dos equipamentos necessários (e utilizados neste estudo) para a extracção por GQ 597,44€ e para o kitQ 1920,09€, havendo uma diferença no custo de 1322,65€. Relativamente aos materiais utilizados para a extracção por GQ, além das micropipetas, os restantes materiais são facilmente substituídos por um banho-maria (99 °C) e uma tesoura. Consequentemente o único custo dos materiais para a extracção de fezes conservadas em papel de filtro seriam os 250,0€ provenientes das micropipetas.

Além destas vantagens, a conservação do material fecal em papel de filtro permite o armazenamento destas à temperatura ambiente durante anos e é um método que permite o fácil manuseamento e transporte das amostras para posterior análise. (QIAcard FTA® Handbook, 2008) Este método foi já anteriormente utilizado com sucesso nos trabalhos de Ferreira (2009) e Fonseca (2009) onde se conseguiu a amplificação e detecção de DNA parasitário (*G.lamblia* e *Entamoeba* spp.) nas amostras de fezes conservadas em papel de filtro.

Através do método molecular da PCR, amplificou-se com sucesso DNA de *Giardia* para o gene *ssurRNA* em 94,7% (18/19) das amostras microscopicamente positivas e em 50,0% (11/22) das amostras positivas por exame microscópico para *Entamoeba* spp., amplificando-se com êxito o fragmento do gene 16S *rRNA*, neste caso de *E. dispar*. Também foi detectado DNA de *Entamoeba* spp em 20,0% (4/20) das



amostras microscopicamente negativas testadas, sendo estas pertencentes à espécie *E. histolytica*.

Das 22 amostras positivas e 20 negativas (mas suspeitas clínicas de Amebíase) para *Entamoeba* spp. por microscopia, apenas 15 foram identificadas através de PCR *nested multiplex* aplicado neste estudo, sendo 11 provenientes das amostras microscopicamente positivas e as restantes quatro das amostras microscopicamente negativas, a diferença observada para ambas as metodologias tem sido igualmente reportada por outros autores (Khairnar e Parija 2007; Fotedar 2007). Estes resultados poderão ser explicados pela presença de outras espécies de *Entamoeba* frequentemente encontradas em humanos, como *E. coli* ou *E. hartmanni*, que são detectadas pela microscopia, mas não pelo PCR, ou devido à presença de um reduzido número de parasitas na amostras originando pequenas quantidades de DNA inferiores ao limite de detecção do PCR (Khairnar e Parija 2007; Fotedar, 2007). Apesar da microscopia permanecer como o principal método de diagnóstico para amebíase, não permite a distinção das espécies de *Entamoeba* (Samie, 2006), como tal das 15 amostras identificadas pela PCR, 11 correspondiam a *E. dispar* todas estas microscopicamente positivas e apenas 4 a *E. histolytica* provenientes dos isolados microscopicamente negativos. A prevalência mundial de *E. histolytica* e *E. dispar*, e mais recentemente de *E. moshkovskii*, como espécies separadas só na última década começou a ser melhor compreendida (Ali, 2007). Dados recentes indicam que *E. dispar* parece ser 10 vezes mais comum que *E. histolytica*, nomeadamente nos países desenvolvidos (Samie, 2006; Fotedar, 2007).

A amebíase é prevalente no sub-continente Indiano, África, Ásia, América do Sul e Central. Nos países desenvolvidos a infecção ocorre principalmente por *E. dispar* e está claramente confinada a determinados grupos, como imigrantes ou viajantes de áreas de grande endemicidade, homossexuais masculinos, doentes com VIH e populações institucionalizadas (Ali, 2007). Há por isso uma grande necessidade de se utilizarem técnicas que possibilitem a distinção destas três espécies, de modo a evitar-se que indivíduos infectados com *E. dispar* ou *E. moshkovskii* sejam tratados desnecessariamente com terapia anti-amebiana (Ali, 2007). Para além disso, o diagnóstico precoce de *E. histolytica* é de extrema importância considerando o seu carácter invasivo (Hove, 2009). Neste aspecto, a utilização de metodologia molecular permite ultrapassar a limitação da microscopia, em particular a técnica de PCR *nested multiplex*.

A infecção por *G. lamblia* é considerada como uma das principais causas de diarreia não-viral nos países desenvolvidos, e é ainda mais frequente em indivíduos com queixas gastrointestinais (Hove, 2009). A escolha do gene *ssurRNA* como alvo para a detecção molecular deve-se principalmente à sua natureza multicópia, o que contribui para uma maior sensibilidade. Adicionalmente apresentam ainda uma elevada especificidade devido à forte conservação da sequência (Nantavisai et al 2007; Cacciò & Ryan, 2008).

A caracterização molecular deste parasita ocorreu com sucesso em 94,7% (18/19) das amostras positivas pela microscopia. Para a não amplificação de DNA de *Giardia* nesta única amostra poderão ter contribuído algumas causas como a presença de inibidores da *Taq polimerase*, que não foram eficientemente removidos durante o

processo de extracção de DNA, longo período e a perda de DNA durante o armazenamento, ou devido à própria eficiência dos ensaios de PCR utilizados. Ao contrário do verificado em outros estudos, tal como Ferreira (2009) e Fonseca (2009) não se detectou DNA de *Giardia* nas amostras microscopicamente negativas, sendo que nos trabalhos referidos detectaram-se adicionalmente pela PCR 6 e 13 amostras positivas para *Giardia*, respectivamente (Gelanew, 2007; Ferreira, 2009; Fonseca, 2009).

Mas a microscopia por si não permite a diferenciação dos genótipos de *Giardia* visto que a morfologia do parasita não varia, nesse sentido os métodos moleculares tornam-se relevantes pois permitem desenvolver métodos para detecção de fontes de infecção, falhas terapêuticas, reinfeções e avaliar a variabilidade genética dentro de *G. lamblia*, para avaliar o papel dos animais na epidemiologia de infecção humana (Cacciò et al, 2008).

A caracterização molecular de isolados de *Giardia* provenientes de diferentes espécies de hospedeiros revela a existência de vários genótipos distintos (Foronda et al 2008). Até à data, apenas os genótipos A e B foram os únicos a serem isolados de humanos, apesar de também terem sido identificados em outras espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos (Thompson and Monis, 2004).

A maioria dos estudos de caracterização molecular é baseada num único *locus* genético. Contudo, a recente análise molecular de isolados de *Giardia* nos *loci* *gdh*, *tpi* e *bg* indicam um elevado grau de variabilidade genética dentro dos genótipos A e B (Wielinga e Thompson, 2007). No estudo de Wielinga e Thompson (2007) utilizou-se uma abordagem baseada na análise *multilocus* das sequências dos genes de cópia

única *gdh*, *tpi* e *bg* para identificação de variabilidade genética. Estes genes são utilizados na genotipagem de *G. lamblia* devido ao seu elevado grau de heterogeneidade genética observada para *Giardia* spp., nestes *locus* (Cacciò & Ryan, 2008).

Recentemente, a divisão dos genótipos dentro da espécie de *Giardia* parece certamente muito mais complexa do que anteriormente se acreditava desde que dados isolados poderiam não ser agrupados no mesmo subgenótipo com base nos dados de genotipagem de diferentes *loci*, portanto, a regra/metodologia para a determinação do subgenótipo e genótipo foi alterada. O subgenótipo de um dado isolado é agora determinado baseada em três loci diferentes, não se baseia em um único gene (Plutzer et al 2010).

Neste estudo para a genotipagem de *Giardia* foram utilizados como alvo os genes da *bg*, *tpi* e *gdh*, por como já referido anteriormente, tratem-se de genes com elevada heterogeneidade genética para *Giardia* spp. Todas as amostras microscopicamente positivas para *Giardia* (n=19) foram testadas para a amplificação dos fragmentos destes genes alvos, *bg* - 511 pb, *tpi* - 530 pb e *gdh* - 530 pb.

Verificou-se amplificação em 52,6% (10/19) das amostras para o gene *bg*; 73,7% (14/19) para o gene *tpi*; 78,9% (15/19) para o gene *gdh*. Estas diferentes taxas de amplificação para os diferentes *locus* está em concordância com o referido em estudos anteriores em que a amplificação de genes de cópia única parece ser irregular, tendo sido relatado que alguns isolados podem ser amplificados em um *locus*, mas não em outro, enquanto que outros isolados podem apenas mostrar o comportamento oposto. Também uma maior variabilidade das sequências pode resultar na inadequada

ligação dos *primers* nas regiões alvo, prevenindo assim a sua amplificação com sucesso (Cacciò & Ryan, 2008).

Relativamente à sequenciação destes isolados, das 10 amostras amplificadas para o gene da *bg*, todos foram sequenciados com sucesso. Para o gene do *tpi* só foi possível a sequenciação em 12 das 14 amostras amplificadas, e para o *gdh* apenas 8 em 15.

Neste estudo, o resultado da análise das sequências das amostras amplificadas para os genes da *bg*, *tpi* e *gdh* (n=13) demonstraram a maior prevalência do genótipo B sendo que 61,5% (8/13) pertenciam a este genótipo enquanto que apenas 38,5% (5/13) pertenciam ao genótipo A. Este resultado está em concordância com o referido em outros estudos em que o genótipo B aparenta ser de um modo geral, o mais comum, apesar da prevalência de cada genótipo poder variar de país para país (Cacciò et al 2005).

Os resultados obtidos por comparação das sequências através do programa BLAST das sequências obtidas com as depositadas no GenBank<sup>TM</sup> são concordantes com os resultados obtidos por identificação de SNP's e análise filogenética destes isolados.

Para se proceder à determinação dos subgenótipos destas amostras, efectuou-se o alinhamento das sequências obtidas por sequenciação para a análise de SNP's usando como referência os dados publicados por Cacciò et al 2008.

Para o gene da *bg* todas as amostras pertencentes ao genótipo A (n=4) foi possível a determinação do subgenótipo, sendo que três amostras correspondiam ao subgenótipo A2 e uma pertencente ao subgenótipo A3. Relativamente às amostras

pertencentes ao genótipo B (n=6), não foi possível a clara associação com qualquer subgenótipo, havendo não só a presença de picos duplos nos respectivos cromatogramas em uma ou mais posições bem como a presença de nucleótidos diferentes em relação às sequências de referência.

Para as amostras sequenciadas para o gene *tpi* (n=12) tanto para as amostras pertencentes ao genótipo A (n=5) como as pertencentes ao genótipo B (n=7) não foi possível a identificação total com qualquer subgenótipo, sendo que para as amostras pertencentes ao subgenótipo A havia apenas a alteração de uma base nucleotídica na posição 108 em todos os isolados em relação à sequência de referência para o subgenótipo A2. Para as amostras pertencentes ao genótipo B a presença de picos duplos em duas ou mais posições não permitiram a determinação dos subgenótipos, bem como a alteração de bases nucleotídicas em duas amostras (206 e 217).

Para o gene *gdh*, as amostras sequenciadas (n=8) também não foi possível qualquer associação com nenhum dos subgenótipos dos genótipos A e B.

Das três amostras amplificadas para este gene pertencentes ao genótipo A, verificou-se a alteração de nucleótidos em duas ou mais posições que não permitiram a associação com qualquer subgenótipo. Para as amostras pertencentes ao genótipo B (n=5) foi a presença de picos duplos em duas ou mais posições em cada amostra que não possibilitou a sua identificação com qualquer subgenótipo.

A presença de picos duplos obtidos nas amostras poderá ter sido devido a presença de quistos geneticamente diferentes na mesma amostra ou devido a artefactos originados pelos métodos da PCR tal como descrito em outros estudos (Lalle et al 2005; Beser et al 2007). Em estudos recentes como o de Cacciò & Ryan 2008

reconhecem a existência de heterogeneidade dentro das próprias sequências de um determinado isolado, considerando haver a mistura de cadeias moldes que afectam assim a identificação dos subgenótipo (Cacciò & Ryan 2008).

O isolado 139 pertencendo ao subgenótipo A3 pelo gene da *bg*, nos restantes genes, *tpi* e *gdh*, aproximou-se ou possuía uma maior homologia com o subgenótipo A2, apesar de não se poder ter estabelecido uma clara e completa identificação com este subgenótipo, devido à alteração de 1 base nucleotídica na posição 108 para o gene do *tpi* e a alteração de 2 bases nucleotídicas nas posições 603 e 621 para o gene do *gdh* em relação à sequência de referência. Nesse sentido esta possível mistura de dois subgenótipos A3 para o gene *bg* e A2 para os genes *tpi* e *gdh* poderá resultar de uma infecção mista, havendo mistura de genótipos ou devido a discordâncias no método de amplificação pela PCR e da sequenciação (Lalle et al 2005).

A realização da análise filogenética para cada gene isolado veio confirmar os resultados obtidos pela análise de SNP's, sendo cada sequência inserida no respectivo agrupamento genotípico.

Foi realizada igualmente a análise filogenética concatenada, com o objectivo de fornecer uma informação mais robusta das sequências. Esta análise concatenada foi realizada em apenas sete amostras (94, 139, 153, 168, 205, 208 e 214) nas quais se conseguiu sequenciar os três genes alvo e confirmou também o resultado previamente obtido com a análise de SNP's, com a única excepção do agrupamento da amostra 139 com um elevado valor de *bootstrap* (88) com o *cluster* do subgenótipo All. Este facto também ocorreu nas árvores isoladas para os genes do *tpi* e *gdh* mas com valores de *bootstrap* de 95 e 51 respectivamente. Na árvore filogenética da *bg* esta amostra foi

agrupada com um valor de *bootstrap* de 63 com o subgenótipo AIII, tal como tinha sido identificada pela análise de SNP's para este gene. Tal como referido anteriormente a amplificação de genes de cópia única pode ser irregular em alguns isolados demonstrando “comportamentos” diferentes em diferentes *loci*, tal como o ocorrido neste caso (Cacciò & Ryan, 2008; Cacciò et al 2008).

Neste estudo não foi possível a associação de isolados com os genótipos de multilocus (MLG) fornecidos por Cacciò et al (2008).

Em estudos de epidemiologia molecular nas regiões endémicas onde a prevalência dos parasitas *G.lamblia* e *Entamoeba* spp é elevada existem muitas dificuldades, que vão desde a colheita de um elevado número de amostras, o seu processamento e armazenamento para posterior análise molecular. As condições de armazenamento são um dos principais factores que podem afectar o sucesso da análise molecular. É bastante comum, neste tipo de estudos as amostras ficarem armazenadas por longos períodos de tempo, de dias a meses, antes de serem processadas, é por isso necessário obter métodos de armazenamento práticos, que facilitem o transporte a partir de áreas remotas e com infra-estruturas precárias e promovam conservação eficiente com baixo custo e requerendo o mínimo de equipamento adicional possível (Wilke & Robertson, 2009).

No presente trabalho, como resultado da comparação das técnicas de conservação de fezes e consequente extracção de DNA verificou-se que o método de conservação das fezes em papel de filtro apresenta-se como um método simples, prático e eficaz. Proporciona um fácil armazenamento e transporte de um grande número de amostras fecais, sem necessitar de uma cadeia de frio. A extracção (GQ) a



partir deste método de conservação revela-se menos exaustivo, de rápida execução, e com um custo consideravelmente inferior (2€/amostra) ao kit comercial (kit Qiagen) comumente utilizado, para além de não necessitar de equipamentos adicionais como, centrífuga, vortex, congelador, etc, que em regiões endémicas podem constituir uma grave limitação (Nantavisai et al 2007).

O uso da microscopia por si só, apesar do baixo custo associado, é uma técnica laboriosa, depende grandemente da experiência do microscopista e necessita de várias técnicas (coloração e concentração) para facilitar a identificação dos agentes patogénicos. Além de que a sua sensibilidade (cerca de 60% para *Entamoeba* spp.; 70% para *Giardia*) e especificidade tem-se revelado inferior quando comparado com as técnicas moleculares segundo vários estudos recentes (Khairnar & Parija, 2007; Hove et al 2009; Ferreira 2009; Fonseca 2009; Plutzer et al 2010).

Nesse sentido torna-se cada vez mais necessário o uso de outras técnicas complementares que permitam colmatar as falhas e limitações que a microscopia tem revelado. Os resultados obtidos neste estudo através do recurso aos métodos moleculares confirmam esta situação em que a detecção e identificação molecular demonstraram um melhor desempenho. Nomeadamente na distinção das espécies do complexo de *Entamoeba* spp, bem como a detecção de DNA parasitário em amostras microscopicamente negativas, em particular *E. histolytica* (em quatro isolados). Com isto torna-se possível evitar o tratamento desnecessário nos casos de microscopia positiva para *Entamoeba* spp. e detectar e consequentemente tratar os casos onde a microscopia falha na detecção de quaisquer organismos parasitários.

Para a exacta discriminação entre os isolados de *G. lamblia* é necessário recorrer-se à caracterização genotípica, pois a morfologia do parasita não varia. Nesse sentido, com a introdução de técnicas de amplificação de DNA a caracterização genética torna-se cada vez mais usual visto permitir detectar as fontes de infecção, as falhas terapêuticas que possam existir, reinfecções ou mesmo avaliar a variabilidade genética para determinar o potencial zoonótico na epidemiologia da doença. Contudo, até recentemente os estudos para a determinação genotípica e subgenotípica tinham sido baseados num único marcador genético. Actualmente, os estudos para a determinação do subgenótipo baseiam-se na análise de três *loci* diferentes. (Cacciò et al 2008; Plutzer et al 2010)

Neste estudo realizou-se a genotipagem para os genes de *G. lamblia* *bg*, *tpi* e *gdh* mas não foi possível a determinação dos subgenótipos através dos 3 genes pela análise de SNP's.

Através da análise filogenética concatenada só foi possível a integração das amostras identificadas com o genótipo A (94, 139 e 214) no subgenótipo All com valores de *bootstrap* elevados. O mesmo não ocorreu com qualquer amostra do genótipo B, evidenciando os polimorfismos já descritos noutros estudos para este genótipo, também demonstrados na análise de SNP's (Cacciò & Ryan 2008; Plutzer et al 2010).

A utilização dos métodos moleculares contribuiu para a detecção e identificação de *G. lamblia* e *E.histolytica* permitindo um diagnóstico mais correcto destes parasitas e subsequente tratamento. O trabalho apresentado evidencia a

importância da implementação dos métodos moleculares no diagnóstico laboratorial de rotina das infecções parasitárias no retorno de viajantes e imigrantes.

Neste trabalho identificou-se um método alternativo para a conservação de material biológico fecal, o papel de filtro, apresentando um menor custo e elevada eficácia em relação aos métodos normalmente utilizados, conservação a -20°C. Os resultados obtidos sugerem que este método de conservação poderá ser utilizado com sucesso em estudos epidemiológicos de larga escala especialmente zonas endêmicas de recursos limitados.

## VI. – Bibliografia

Abd-Alla MD, Wahib AA, Ravdin JI, Comparison of antigen-capture ELISA to stool-culture methods for the detection of asymptomatic *Entamoeba* species infection in Kafer daoud, Egypt. Am J Trop Med Hyg. 2000 May;62(5):579-82.

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:447-75.

Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr, Molecular epidemiology of amebiasis. Infect Genet Evol 2008; 8, 698-707.

Ali IK, Hossain MB, Roy S, et al., *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2003, 9, 580-584.

Almeida AA, Delgado MA, Soares SC, et al Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal, *J. Eukaryot. Microbiol.* **53** (Suppl. 1) 2006, pp. S177–178.

Aranda-Michel J, Giannella RA, Acute diarrhea: A practical review. Am. J. Med. 1999; 106: 670–6.

Beser J, Hagblom P, Fernandez V, Frequent in vitro recombination in the internally transcribed spacer during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. J Clin Microbiol, 2007; 45:881-6.

Cacciò SM, Beck R, Lalle M, et al, Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. Int J Parasitol 2008, 38:1523-1531.

Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of *giardiasis*. Mol Biochem Parasitol. 2008; 160:75-80.

Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, et al., Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005; 21:430-7.

Cavalier-Smith T, A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1998, 73:203–266.

Cavalier-Smith T, Only six kingdoms of life. Proc. R. Soc. Lond. B 2004 271, 1251–1262.

Clark CG, Diamond LS, Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. Arch. Med. Res. 1992 23:15–16.

Clark CG, Diamond LS, Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol. Biochem. Parasitol, 1991, 49:297–302.

Cruz-Reyes JA, Spice WM, Rehman T, et al., Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Parasitology 1992, 104:239–246.

Ekdahl K, Andersson Y. Imported *giardiasis*: Impact of international travel, immigration, and adoption. Am J Trop Med Hyg. 2005; 72:825-30.

Espelage W, Heiden M, Stark K, et al, Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany BMC Public Health 2010, 10:41.

Farthing MJG, Cevallos AM, Kelly P, Manson's Tropical Disease. 2009, 22ed. Elsevier. P 1375– 406.

Ferreira F, Identificação de genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de animais domésticos e do homem. *Dissertação Mestrado Doenças infecciosas emergentes*, Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa; 2009.

Fonseca A, Prevalência e caracterização molecular de protozooses intestinais em crianças no Hospital central de Maputo. Dissertação Mestrado em Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2009.

Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, et al., Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res.* 2008, 103:1177-81.

Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, et al, Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin. Microbiol.* 2007, Rev. 20:511–532.

Garcia LS, Diagnostic Medical Parasitology. 2001, 4ed. ASMpress P6 – 49.

Gardner TB, Hill DR, Treatment of *Giardiasis* *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2001, p. 114–128.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, et al., Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007; 102:92-9.

Ghosh S, Debnath A, Sil AS, et al, PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol. Cell. Probes*, 2000 14:181–189.

Haque R, Petri WA Jr., Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Archives of Medical Research*, 2006 vol. 37, no. 2, pp. 272–275.

Hill DR, *Giardiasis: Issues in diagnosis and management*. Infectious Diseases Clinics of North America 1993, 7:503-525.

Hill DR, Nash TE, Tropical Infectious Diseases. 2005, 2nd ed. Elsevier P984 – 93.

Homan WL, Mank TG, Human *giardiasis*: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001; 31:882-6.

Hove RJ, Esbroeck MV, Vervoort T, et al Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009, vol. 28, no. 9, pp. 1045–1053.

Huh JW, Moon SG, Lim YH, A Survey of Intestinal Protozoan Infections among Gastroenteritis Patients during a 3-Year Period (2004-2006) in Gyeonggi-do (Province), South Korea Korean J Parasitol. Vol. 47, No. 3: 303-305, September 2009 DOI: 10.3347/kjp.2009.47.3.303.

Katz DE, Taylor DN, Parasitic infections of the gastrointestinal tract. Gastroenterol Clin North Am. 2001; 30:797-815.



Khairnar K, Parija SC, A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. BMC Microbiology. 2007 7:47.

Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV, Common intestinal parasites. Am Fam Physician, 2004; 69:1161-8.

Kulda, J, Nohýnková E, *Giardia* in Humans and Animals. In: KREIER, J.P. (Ed.) Parasitic Protozoa, 2a. ed.San Diego: Academic Press, 1995. v. 10, p. 225-422.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, et al., Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardina locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol, 2005, 35: 207-213.

Leo M, Haque R, Kabir M, et al, Evaluation of *Entamoeba histolytica* antigen and antibody point-of-care tests for the rapid diagnosis of amebiasis. Journal of Clinical Microbiology, 2006 vol. 44, no. 12, pp. 4569–4571.

Li E, Stanley SL, 1996. Protozoa. Amebiasis. Gastroenterol Clin North Am., 1996, 25(3):471-492.

Lopez SA, Rodríguez LG, Coronado X, et al Prevalence of intestinal parasitism and associated factors in a village on the Colombian Atlantic Coast. Rev Salud Publica 2008, 10:633–42.

Mbuh JV, Ntonifor HN, Ojong JT, The incidence, intensity and host morbidity of human parasitic protozoan infections in gastrointestinal disorder outpatients in Buea Sub Division, Cameroon. JIDC January 2010, Vol 4, No 01.

Mohammadi SS, Genkinger JM, Loffredo CA, et al, A Meta-analysis of the Effectiveness of Albendazole Compared with Metronidazole as Treatments for Infections with *Giardia duodenalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2010 May 11;4(5):e682.

Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2007; 45:581-3.

Nunez YO, Fernandez MA, Torres-Nunez D, et al., Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001, 64:293–297.

Olson ME, O’Handley RM, Ralston BJ, et al, Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle, Trends Parasitol. **20** 2004, pp. 185–191.

Ortega YR, Adam RD, *Giardia*: Overview and Update. Clin. Inf. Disease 1997, 25:545-50.

Ouattara M, N’Gue’ssan N, Yapi A, et al Prevalence and Spatial Distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among Schoolchildren in Agboville Area (Côte d’Ivoire). PLOS Neglected Tropical diseases, 2010.

Parija SC, Khairnar K, Detection of *E.histolytica* DNA in the urine, and detection of *E.histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. BMC.Macrob. 2007, 7:41.

Parija SC, Khairnar K, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. J. Health Pop. Nutr. 2005, 23:292–295.

Petri WA, Singh U Jr, Tropical Infectious Diseases. 2005, 2nd ed. Elsevier P967 – 79.

Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, et al, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. Clinical Infectious Diseases, vol. 29, 1999 no. 5, pp. 1315–1318.

Pinilla AE, López MC, Viasus DF, History of the *Entamoeba histolytica* protozoan.

Revista Médica de Chile, 2008, vol. 136, no. 1, pp. 118–124.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis P, *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health, in Press 2010.

R. Haque, N. U. Mollah, I. K. M. Ali, et al., "Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests," *Journal of Clinical Microbiology*, 2000 vol. 38, no. 9, pp. 3235–3239.

Read C, Walters J, Robertson ID, et al., Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int. J. Parasitol 2002, 32, 229-231.

Roberts LS, Janovy JJ. Other flagellated protozoa. In: Foundations of Parasitology 2005 70th ed. McGrawHill New York p. 90-5; 107 - 16.

Samie A, Obi LC, Bessong PO, et al., Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2006, 75(3):565-71.

Scheffler EH, Van Etta LL, Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. J. Clin. Microbiol. 1994, 32:1807–1808.

Schuster FL, Visvesvara GS, Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. Vet Parasitol. 2004, 126:91–120.

Singh A, Houpt E, Petri WA, Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009: 547090.

Stanley SL, Amoebiasis. Lancet 2003, 361:1025-1034.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis. 2003;9:1444–1452.

Tamura K, Dudley J, Nei M, et al., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007; 24:1596-9.

Tannich E, Burchard GD, Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. Journal of Clinical Microbiology, 1991 vol. 29, no. 2, pp. 250–255.

Tanyuksel M, & Petri WA, Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Clin. Microbiol. Rev. p. 2003 713-729.

Tessier JL, Davies GAL, *Giardiasis*. *Infect. Diseases Update* 1999, 98:175-179.

Thompson RC, Monis, PT, Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*. 2004, 58:69-137.

Thompson RCA, The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *giardiasis*, *Vet. Parasitol*. 126 2004, pp. 15–35.

Thompson RCA. *Giardiasis* as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. *Int J Parasitol*. 2000; 30:1259-67.

van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, et al., Use of rapid dipstick and latex agglutination tests and nzymelinked immunosorbent assay for serodiagnosis of amebic liver abscess, amebic colitis, and *Entamoeba histolytica* cyst passage. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006 vol. 43, no. 9, pp. 4801–4806, 2005.

van Hal S, Stark D J, Fotedar R, et al, Amebiasis: current status in Australia. *Med. J. Aust*. 2007: 186:412–416.

Walterspiel JN, Pickering LK, *Giardia* and *giardiasis*. *Prog Clin Parasitol* 1994, 4:1-26

Wang Z, Vora GJ, Stenger DA, Detection and Genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by Oligonucleotide Microarray. *J Clin Microbiol* 42, 2004, pp. 3262–3271.

Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, et al Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:656–659.

WHO. 1994 – Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites. World Health Organization. Geneva. Switzerland.

WHO. 2001 Burden of disease in disability-adjusted life years (DALYs) by cause, sex and mortality stratum in WHO regions. Geneva: WHO.

Wielinga CM, Thompson RCA, Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*, 2007; 134:1795-1821.

Wilke H, Robertson LJ, Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Meth* 2009, 78:292-296.

Wolfe MS, *Giardiasis*. *Clin Microbiol Rev*. 1992, 5:93-100.

**Websites:**

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm>, Acedido pela última vez a 15 de Agosto de 2010.

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>, Acedido pela última vez a 15 Agosto de 2010.